

Статус	может прекратить действие в соответствии со ст. 30 Патентного закона (по данным на 07.02.2005)		
(11) Номер публикации	2160746		
(13) Вид документа	C2		
(14) Дата публикации	2000.12.20	Поиск	
(19) Страна публикации	RU		
(21) Регистрационный номер заявки	94038426/04		
(22) Дата подачи заявки	1993.01.07		
(24) Дата начала действия патента	1993.01.07		
(31) Номер конвенционной заявки	07/818,753		
(32) Дата подачи конвенционной заявки	1992.01.09		
(33) Страна приоритета	US		
(46) Дата публикации формулы изобретения	2000.12.20	Поиск	
(516) Номер редакции МПК	7		
(51) Основной индекс МПК	C08G71/02	Поиск	МПК
(51) Основной индекс МПК	C08G64/08	Поиск	МПК
(51) Основной индекс МПК	C08G69/32	Поиск	МПК
(51) Основной индекс МПК	C07C309/51	Поиск	МПК
(51) Основной индекс МПК	A61K31/795	Поиск	МПК
(51) Основной индекс МПК	A61K31/74	Поиск	МПК
(51) Основной индекс МПК	A61P31/12	Поиск	МПК
(51) Основной индекс МПК	A61P31/18	Поиск	МПК
Название	УЗКОПОЛИ- И МОНОДИСПЕРСНЫЙ ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ОЛИГОМЕР, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ, СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ВИРУСОВ		
(56) Аналоги изобретения	EP 0043974 A, 20.01.1982. GB 781479 A, 21.08.1957. FR 2669535 A, 29.05.1992. US 4604404 A, 05.08.1986. SU 905228 A, 15.02.1982.		
(71) Имя заявителя	ДЗЕ ДАУ КЕМИКАЛ КОМПАНИ (US)	Поиск	
(71) Имя заявителя	МЕРРЕЛЛ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ИНК. (US)	Поиск	
(72) Имя изобретателя	Алан Д. КАРДЕН (US)	Поиск	
(72) Имя изобретателя	Уилльям А. ФОРДАЙС (US)	Поиск	
(72) Имя изобретателя	Майкл Дж. МАЛЛИНС (US)	Поиск	
(72) Имя изобретателя	Томас ЧЕМБЕРЛИН (US)	Поиск	
(72) Имя изобретателя	Майкл Дж. ФАЗИО (US)	Поиск	
(73) Имя патентообладателя	ДЗЕ ДАУ КЕМИКАЛ КОМПАНИ (US)	Поиск	
(73) Имя патентообладателя	МЕРРЕЛЛ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ИНК. (US)	Поиск	
(85) Дата соответствия ст.22/39 РСТ	1994.07.08		
(86) Номер и дата международной или региональной заявки	US 93/00094 (07.01.1993)		
(87) Номер и дата международной или региональной публикации	WO 93/14146 (22.07.1993)		
(98) Адрес для переписки	129010, Москва, ул. Большая Спасская 25, стр.3, ООО "Городисский и Партнеры", Лебедевой Н.Г.		

**№2160746. Описание. Часть 1****Часть 1 Часть 2**

Изобретение касается узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров, их получения, препаратов и применения в качестве ценных средств против активности вируса человеческого иммунодефицита. Эти монодисперсные анионные олигомеры, таким образом, применимы при лечении синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и при лечении заболеваний, вызванных вирусом Herpes Simplex (HSV) типа 1 и 2 и цитомегаловирусом.

Большое число исследований ведется в настоящее время по разработке терапии и методов лечения вирусных инфекций у людей и животных, особенно вызванных вирусом Herpes Simplex (HSV) типов 1 и 2 и СПИД и связанного со СПИД комплекса (КСС). Частота СПИД и КСС у людей увеличивается с особенно тревожащей скоростью. Пятилетний срок жизни заболевших СПИД удручает, а больные СПИД, чья иммунная система серьезно нарушена инфекцией, страдают от многочисленных инфекций, вызванных условнопатогенными возбудителями, включая саркому Капоши и пневмонию, вызываемую *Pneumocystis carinii*. Способ лечения СПИД неизвестен, и текущая терапия в большинстве случаев применяется без достаточных доказательств эффективности и имеет многочисленные неблагоприятные побочные эффекты. Страх перед болезнью привел к социальному остракизму и дискриминации в отношении заболевших или подозреваемых на заболевание людей.

Ретровирусы являются классом вирусов, содержащих рибонуклеиновую кислоту (РНК), которые реплицируются с помощью обратной транскриптазы с образованием цепочки комплементарной ДНК (кДНК), из которой продуцируется двухцепочечная провирусная ДНК. Эта провирусная ДНК затем случайным образом включается в хромосомную ДНК клетки-хозяина, делая возможной репликацию вируса путем

более поздней трансляции вирусной информации с интегрированного вирусного генома.

Многие из известных ретровирусов являются онкогенными или вызывающими опухоль. В самом деле, первые два открытых человеческих ретровируса, обозначенных как вирусы I и II человеческого Т-клеточного лейкоза или HTLV-I и II, как было обнаружено, вызывают редкие лейкозы у людей после инфицирования Т-лимфоцитов. Третий такой человеческий вирус, который был открыт, HTLV-III, теперь называемый ВИЧ, как было обнаружено, вызывает гибель клеток после инфицирования Т-лимфоцитов, и был идентифицирован как этиологический агент СПИД и КСС.

Белок оболочки ВИЧ представляет собой гликопротеин в 160 кДа. Этот белок расщепляется протеазой с получением наружного белка в 120 кДа, gp 120, и трансмембранного гликопротеина, gp 41. Белок gp 120 содержит аминокислотную последовательность, которая распознает антиген CD 4 на человеческих Т-хелперных (Т4) клетках.

Один используемый подход состоит в предотвращении связывания ВИЧ с его мишенью, клетками Т4 у людей. Эти клетки Т4 имеют специфическую область, антиген CD4, который взаимодействует с gp 120. Если это взаимодействие можно будет разорвать, то инфицирование клеток-хозяев может быть подавлено.

Вмешательство в образование вирусного оболочечного белка могло бы предотвратить первичное взаимодействие вируса и клетки-хозяина или последующее слияние, или могло бы предотвратить дупликацию путем предотвращения построения соответствующего гликопротеина, необходимого для завершения мембраны вируса. Сообщалось (смотрите Н. А. Blough et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 141(1), 33-38 (1986), что ингибиторы неспецифического гликозилирования, 2-дезоксид-Д-глюкоза и  $\beta$ -гидроксинорвалин подавляют

экспрессию гликопротеинов ВИЧ и блокируют образование синцития. Размножение вируса в инфицированных ВИЧ клетках, обработанных этими веществами, останавливается, по-видимому, из-за отсутствия гликопротеина, необходимого для образования мембраны вируса. В другом сообщении говорится (W. Mc Dowell et. al., Biochemistry, 24 (27), 8145-52 (1985), что как было обнаружено, ингибитор гликозилирования, 2-дезоксид-2-фтор-D-манноза, подавляет противовирусную активность в отношении инфицированных вирусом гриппа клеток через предотвращение гликозилирования вирусного мембранного белка. В этом сообщении также говорится о том, что была изучена противовирусная активность 2-дезоксиглюкозы и 2-дезоксид-2-фторглюкозы и обнаружено, что каждая подавляла гликозилирование вирусного белка с помощью различных механизмов. Однако, как было показано, другие известные ингибиторы гликозилирования не обладают противовирусной активностью. Таким образом, противовирусная активность в отношении вирусов вообще и специфическая противовирусная активность ингибиторов гликозилирования совершенно непредсказуема.

Проводятся в настоящее время по всему миру исследования по разработке терапии и способов лечения инфекций, вызванных HSV типа 1 и 2. Оба HSV типа 1 и 2 демонстрируют предрасположенность к инфицированию эктодермальных тканей, где такое инфицирование вирусом вызывает поражения на коже, ротовой полости, влагалища, конъюнктивы и нервной системы. В основном, инфицирование HSV типа 1 (HSV) связано с поражениями ротовой полости, лица и глаз. Инфицирование HSV типа 2 (HSV 2) в основном приводит к генитальным и анальным повреждениям. Инфекции HSV, оставленные нелеченными, часто приводят к слепоте, смерти новорожденных и энцефалиту. Инфекции, вызванные HSV типа 2, находятся на эпидемическом уровне в США в результате передачи половым путем. В настоящее время больше чем примерно двадцать миллионов человек поражены этим

заболеванием в этой стране при свыше полумиллиона новых случаев и рецидивов ежегодно. Ежегодные затраты по HSV инфекциям приводят к существенным экономическим потерям на диагностику и лечение. Эпидемиологический контроль инфекций HSV очень слаб из-за того, что большинство населения, до 90%, подвергались заражению этим вирусом.

Человек служит естественным хозяином для инфекций, вызванных HSV типов 1 и 2, причем вирус передается во время тесного персонального контакта. Начальное или первичное инфицирование HSV типа 1 и 2 происходит через разрывы слизистой оболочки. У здорового носителя вирус может быть выделен из слез, слюны, вагинальных и других секретов, даже при отсутствии явного заболевания. Из слизистой оболочки они способны реплицироваться и распространяться в региональные лимфатические узлы. Иногда эти вирусы могут инфицировать клетки системы гемопоэза и вызывать виремию.

Часть затруднений при лечении HSV инфекций возникает из-за способности этих вирусов персистировать в латентной или покоящейся форме. Когда первичная инфекция стихает или отступает, вирус, в основном, остается в латентной форме в чувствительных нервных ганглиях, которые иннервируют место первичной инфекции. При глазных или оральных инфекциях, вызванных HSV типа 1, вирус обычно остается в тройничном ганглии. При инфекции, вызванной HSV типа 2, вирус в основном остается в крестцовом ганглии, обслуживающем гениталии и нижнюю часть брюшной полости. Определяющий период латентности HSV неизвестен, кроме того, этот период может быть нарушен перегревом, охлаждением, солнечным облучением, гормональными и эмоциональными отклонениями или иммуносупрессивными средствами, приводя, в основном, к повторной инфекции. Лечение HSV инфекций, в основном, неэффективно. Был разработан целый ряд стратегий, чтобы остановить вирус. Эти средства, в основном, подавляют любой

одну из ряда специфических функций вируса, таких как (1) адсорбция, (2) утрата оболочки, (3) транскрипция, (4) синтез белка, (5) репликация нуклеиновой кислоты, (6) созревание и (7) выделение.

Большинство противовирусных средств, используемых до сих пор для лечения HSV инфекций, были веществами, которые вмешиваются в синтез вирусной ДНК. Эти вещества включают идоксуридин, цитозин, арабиноза, аденинарабинозид и трифтортимидин. Такие вещества вмешиваются также и в сходные функции клетки-хозяина, что приводит к общим проблемам клеточной токсичности и систематического использования у людей. В настоящее время ацикловир является предпочтительным лекарственным средством для лечения инфекций, вызванных HSV 1 и HSV 2 благодаря его сильному противовирусному действию и незначительной токсичности. Однако, слабая растворимость при высокой дозировке и появление лекарственноустойчивых вирусов ограничивает применение этого лекарства.

Ряд РНК- и ДНК-содержащих вирусов имеют оболочки, в которые включаются кодируемые вирусом гликопептиды. HSV и цитомегаловирус (ЦМВ) являются двумя такими оболочечными вирусами. Инфицирование клетки-хозяина оболочечными вирусами изначально основывается на взаимодействии различных рецепторов на поверхности клетки-хозяина с оболочечными гликопротеинами мембраны вируса. Затем вирусная и клеточная мембраны сливаются, и содержимое вириона вливается в цитоплазму клетки-хозяина. Содержащая гликопротеин оболочка вируса играет важную роль как в первоначальном взаимодействии вириона и клетки-хозяина, так и в последующем слиянии мембран вируса и клетки-хозяина. По-видимому оболочка вируса происходит из клеточной оболочки, но ее специфичность связана с кодируемыми вирусом гликопептидами. Поэтому, ингибитор, способный быть

помехой образованию вирусспецифических мембран, может предотвращать образование инфицирующего потомства вируса.

В Европейской заявке 04065512, опубликованной 9 января 1991 г., было раскрыто, что очищенная форма гепарина, сульфатированного полисахарида, связывается через взаимодействие с вирусным белком, который ответственен за распознавание клетки и создает ограниченное подавление инфицирования клетки-хозяина. Однако, гепарин вызывает некоторые побочные эффекты, особенно кровоизлияния и увеличенное время образования сгустка, а также тромбоцитопению. Применение гепарина противопоказано у больных с активным кровотечением или с гемофилией, пурпурой, тромбоцитопенией, внутричерепным кровоизлиянием, бактериальным эндокардитом, активным туберкулезом, повышенной капиллярной проницаемостью, язвенными поражениями желудочно-кишечного тракта, тяжелой гипертонией, угрозой аборта или висцеральной карциномой. Особый интерес представляет противопоказание для применения у больных гемофилией, так как в настоящее время много таких лиц являются сероположительными на ВИЧ.

Давно известно, что определенные синтетические водорастворимые полимеры проявляют широкий спектр биологической активности. (R. M. Ottenbrite b "Biological Activities of Polymers". Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. N 182, pp. 205-220, eds. C. E. Carsaheer and C.G. Gebelein (1982)). Как было показано, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида активен против ряда вирусов, и его использование при химиотерапии рака изучалось в течение ряда лет (Breslow D. S. Pure and Applied, Chem, 46, 103 (1976)). Полиакриловый, полиметакриловый и ряд других алифатических каркасных водорастворимых полимеров, как было показано, также обладают широким спектром биологической активности (W. Regelson et al., Nature 186, 778 (1960)). Европейская заявка 0043974 раскрывает сульфонированные полиуретаны, которые не имеют желаемого противовирусного применения.

Британский патент 781479 раскрывает разделение сульфонированных полимочевин путем центрифугирования, но средний показатель полученного молекулярного веса составляет 10000 или более. К сожалению, чрезвычайная токсичность этих полимеров препятствовала их клиническому применению. К тому же эти полимеры имеют высокий молекулярный вес и не способны проходить через почечные мембраны.

Были предприняты попытки преодолеть проблемы токсичности и экскреции путем синтеза алифатических полимеров с низким молекулярным весом (от 1000 до 10000) (P.M. Ottenbrite в "Biological Activities of Polymers".. Ames. Chem. Soc. Symp. Ser. N 182, pp. 205-220, eds. C.B. Cassaher and C.G. Gebelein (1982)). Было обнаружено, что такие полимеры менее токсичны, но имеют намного сниженную противовирусную активность. Эти алифатические полимеры с низким молекулярным весом могут быть классифицированы как полимеры "дающие статистический клубок". Такие полимеры имеют непредсказуемую конфигурацию из-за гибкости каркасных связывающих групп. Конфигурация полимеров, дающих статистический клубок в растворе, в основном, может быть описана как шарообразная. Хотя механизм действия таких водорастворимых полимеров неизвестен, одно из требований состоит в том, что этот полимер связывается с оболочкой вируса, например, вируса, вызывающего энцефаломиокардит, посредством ионного притяжения, таким образом делая вирус неспособным инфицировать клетки-хозяева.

Дополнительный подход с применением синтетических полимеров состоит в помещении ионных групп на каркас полимера, который проявляет более определенную геометрию. Существуют многочисленные примеры неионных синтетических полимеров, которые показывают более линейную геометрию в неводном растворе, чем проявляют алифатические полимеры, описанные выше (J. Macromol. Sci. Reviews in Macromol. Chem, Phys., C26(4), 551 (1986)). Определяющие



факторы, которые вызывают эту структуру нестатистического клубка, сложны и плохо поняты. В основном, такие полимеры имеют или очень ограниченное число вращаемых связей, которые не параллельны оси полимера, или существует водородное связывание или дипольные взаимодействия, которые благоприятствуют линейным структурам. Эти полимеры называются имеющими "жесткий каркас". Полиамид, полученный из терефталевой кислоты и П-диаминобензола (известный под коммерческим названием Кевлар, поставляемый фирмой Du Pont), хорошо известный пример таких полимеров.

Синтетические водорастворимые жесткие полимеры значительно менее обычны, но известно несколько примеров с высоким молекулярным весом (например, смотрите патенты США 4824916 и 4895660). Структура этого класса полимеров, не образующих статистический клубок, приводит к высокой для данного молекулярного веса и концентрации вязкости растворов.

Были обнаружены некоторые анионные олигомеры, которые подавляют репликацию вируса без побочных эффектов, демонстрируемых гепарином. Олигомеры имеют упорядоченное размещение анионов, жесткий каркас и растворимы в воде.

Олигомеры в виде полидисперсных смесей были описаны в Европейской заявке 0467185, опубликованной 22 января 1992 г. Хотя в этих заявках раскрываются различные анионные олигомеры, все анионные олигомеры были смесями соединений с различным молекулярным весом.

Ясно, что было бы желательно найти терапию и метод лечения СПИД, КСС и HSV инфекций, которые проявляли бы минимальное побочное действие или его отсутствие и создавали бы явное превосходство над полимерами, ранее используемыми в качестве фармацевтических препаратов. К тому же, такие олигомеры должны, предпочтительно, иметь узкий интервал молекулярных весов, низкую токсичность и легко определяемые характеристики.

В сопровождающих фиг. 1-4 по вертикальной оси откладывается поглощение в УФ области, а по горизонтальной оси - время в минутах.

Фиг. 1 показывает неочищенную полидисперсную сульфонированную полимочевину формулы 1 с широкой полидисперсностью в качестве исходного материала.

Фиг. 2 показывает снижение дисперсности после стадии 1, что определено на странице 11, от грубой полидисперсной сульфонированной мочевины с фиг. 1 до узкой полидисперсности сульфонированной полимочевины, как одной из нескольких фракций.

Фиг. 3 показывает комбинацию фракций с 7 по 17 при гельфильтрационной хроматографии сырого полидисперсного олигомера с фиг. 1, в качестве рекомбинации фракций с фиг. 2.

Фиг. 4 показывает монодисперсный олигомер сульфонированной полимочевины, фракционированный из грубого полидисперсного олигомера с фиг. 1, с применением жидкостной хроматографии с обращенной фазой.

На фиг. 5-9 по вертикальной оси - относительное поглощение, а по горизонтальной оси - время в минутах.

Фиг. 5 показывает различные профили ВЭЖХ полимочевины с формулой I.

Фиг. 6 показывает профиль ВЭЖХ узкополидисперсной полимочевины с формулой I, при использовании водного раствора триметиламинацетата ( $\text{Et}_3\text{NHOAc}$ ) в качестве элюента.

Фиг. 7 показывает профиль ВЭЖХ узкополидисперсной полимочевины с формулой I, при использовании водного раствора тетрабутиламмонийфосфата ( $\text{n-Bu}_4\text{N})\text{PO}_4$ ) в качестве элюента.

Фиг. 8 показывает профиль ВЭЖХ фракций монодисперсной полимочевины с формулой I с фиг. 6 при использовании водного раствора тетрабутиламмонийфосфата ( $\text{n-Bu}_4\text{N})\text{PO}_4$ ) в качестве элюента.

Фиг. 9 показывает гистограмму антивирусных концентраций  $IC_{50}$  различных фракций олигомеров, содержащих повторяющиеся единицы, от 3 до 50, которые соединяются связывающими карбонильными частями, причем вышеназванные олигомеры имеют анионные группы и преобладающую линейную геометрию, так что между анионными группами в водной среде существуют постоянные интервалы. Предпочтительные олигомеры этого изобретения представляются любой одной из формул I-IV, представленных ниже.

Способ производства настоящего изобретения позволяет получить ограниченно поли- и монодисперсные анионные олигомеры этого изобретения, особенно те, которые представлены формулами I-IV, помещенными ниже, с помощью стадий:

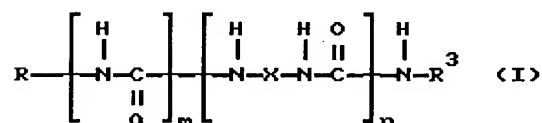
- 1) ограничения необработанной полидисперсной смеси анионных олигомеров до узкополидисперсной смеси анионных олигомеров, и/или
- 2) выделения монодисперсного анионного олигомера, и
- 3) по желанию, превращения солей узкополи- или монодисперсных олигомеров со стадий 1 и 2 в желаемую фармацевтически приемлемую соль, конкретно, натриевую или калиевую соль.

В вышеназванном процессе имеется в виду следующее сочетание стадий: стадии 1 и 2 выполняется отдельно, стадия 1 или 2, за которой следует стадия 3, или осуществляются все три стадии.

Узкополи- и монодисперсные олигомеры применимы в качестве средств, подавляющих активность вируса иммунодефицита человека и вируса Herpes Simplex, и таким образом, эти олигомеры применимы при лечении СПИД, КСС и инфекций, вызываемых HSV. Настоящее изобретение включает узкополи- и

монодисперсные олигомеры, получение их лекарственных форм и применение в качестве средств для лечения СПИД, КСС и инфекций, вызванных HSV и способ их производства.

Узкополи- и монодисперсные анионные олигомеры настоящего изобретения являются водорастворимыми олигомерами, содержащими повторяющиеся единицы, от 3 до 50, которые соединяются связывающими карбонильными частями, причем вышеназванные олигомеры имеют анионные группы и преобладающую линейную геометрию, так что в водной среде существуют постоянные промежутки между анионными группам. Предпочтительно, эти олигомеры представляются любой одной из следующих формул:



где R представляет атом водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкильную группу, фенильную группу или фенильную группу, имеющую от 1 до 2 частей R<sub>1</sub> и до 3 заместителей, независимо выбираемых из атомов фтора, хлора и брома или C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкильных групп,

R<sub>1</sub> представляет -SO<sub>3</sub>R<sup>2</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, -PO<sub>3</sub>(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub> или -OPO<sub>3</sub>R<sup>2</sup>,

R<sub>2</sub> представляет атом водорода или фармацевтически приемлемый катион,

m = 0 или 1, при условии, что когда m = 0, R является атомом водорода,

X представляет (см. фиг. 10),

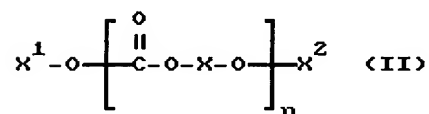
Y представляет  $-\text{CO}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ,  $-\text{N}=\text{N}-$ ,



$n = 3 - 50$ , и

$\text{R}_3$  представляет  $-\text{R}$  или  $-\text{X}-\text{NH}_2$ , где R и X дается определение, как и ранее,

В) поликарбонат формулы

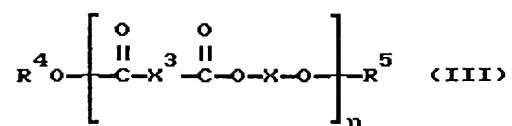


где X и n дается определение, как и в формуле I, выше,

$\text{X}^1$  представляет  $\text{HO}-\text{X}-$  группу, где X дается определение как и для формулы I, выше, или  $\text{C}_1-\text{C}_4$  алкильную группу, фенильную группу или фенильную группу, замещенную от 1 до 2 составляющими  $\text{R}^1$  и до 3 заместителей, независимо выбираемых из атомов фтора, хлора или брома или алкильных групп  $\text{C}_1-\text{C}_{20}$ , и

$\text{X}^2$  представляет атом водорода или  $-\text{CO}_2\text{X}^1$ , где  $\text{X}^1$  дается определение как и выше,

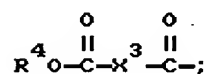
С) полиэфир формулы



X и n дается определение как и в формуле I, выше,

$R^4$  представляет  $-R^2$ , которому дано определение в формуле I, или  $-X^1$ , которому дано определение в формуле II, выше,

$R^5$  представляет



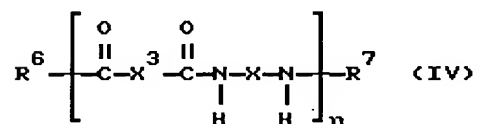
где  $R^4$  дается определение как и в формуле III, выше, или  $-R^2$ , где

$R^2$  дается определение как и в формуле I, выше;

$X^3$  представляет (см. фиг. 11).

где  $R^1$  и Y дается определение как и в формуле I, выше; или

D) полиамид с формулой:



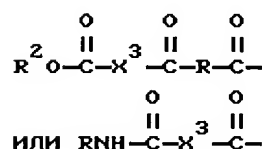
где X и n дается определение как и в формуле I, выше,

$X^3$  дается определение как и в формуле III, выше,

$R^6$  представляет  $H_2N-X-NH-$ ,  $R^2O-$ ,  $RNH-$  или  $R-C(O)-NH-X-NH-$ ,

где  $R$ ,  $R^2$  и  $X$  дается определение как и в формуле I,

$R^7$  представляет атом водорода,



где  $R$  и  $R^2$  дается определение как в формуле I, выше, и

$X^3$  дается определение как в формуле III, выше.

Терминам, использованным в настоящей заявке, даются следующие определения:

Термин " $C_1$ - $C_{20}$ алкил", заключающий в себе термин " $C_1$ - $C_4$ алкил", включает как группы с разветвленной, так и с прямой цепью, такие как, например, метил, этил, изопропил, т-бутил, н-децил, н-додесил и тому подобные.

Термин "фармацевтически приемлемый катион" означает катион, приемлемый для фармацевтического использования. Те катионы, которые по существу нетоксичны при дозировке, применяемой для достижения желаемого эффекта, и самостоятельно не обладают значительным фармакологическим действием, включается в термин "фармацевтически приемлемый катион". Для иллюстрации, эти соли включают соли щелочных металлов, таких как натрий и калий,

щелочноземельных металлов, таких как кальций и магний, аммония, легких металлов группы IIIA, включая алюминий, и органических катионов, производных первичных, вторичных и третичных аминов, аммония или алкиламмония, особенно третичные соли аммония. Примеры включают триалкиламины, включающие триэтиламин, прокаин, дибензиламин, N,N'-дибензилэтилендиамин, дигидроадиэтиламин, N-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкилпиперидин и любой другой подходящий амин. Предпочтительны натриевые и калиевые соли. Термин "фармацевтически приемлемый" означает пригодный для введения теплокровным животным, особенно людям, и включает являющийся нетоксичным, например, пригодный для фармацевтического использования и неядовитый для теплокровных животных. Фармацевтически приемлемые катионы олигомеров настоящего изобретения получают с помощью общепринятых ионообменных процессов или путем обработки R<sup>1</sup>-кислоты подходящим основанием. В частности, триэтиламмониевые соли, которые получают в части способа производства (стадия 2), превращаются в более предпочтительные фармацевтически приемлемые соли, такие как натриевая соль.

Олигомеры настоящего изобретения являются узкополи- и монодисперсными водорастворимыми полимерами с низким молекулярным весом. Кроме того олигомеры имеют упорядоченное расположение анионов. Термин "упорядоченное расположение анионов" или "постоянный интервал между анионными группами" означает, что анионные группы (R<sup>1</sup>) присутствуют на каркасе полимера с интервалами, определяемыми исходным материалом использованного реагента, и местонахождение анионных групп регулируется предсказуемым образом. Не желая пока быть связанными какой-либо теорией, полагают, что анионные группы олигомеров являются частью, которая связывается с ВИЧ, HSV и/или клеточной мембраной и тем самым прерывает способность вируса к репликации.



Термины "преимущественно линейная геометрия" в водной среде относится к конфигурации олигомера в растворе. Метод для характеристики конфигурации молекул полимера в растворе, хорошо известный в этой области знаний, основан на следующей формуле, называемой уравнением Mark-Houwink ("Introduction to Physical Polymer Science ed. L.H.Sperling, pub. John Wiley & Sons; (1985), pp.81-83)

$$[\eta] = KM^\alpha,$$

где  $\eta$  является собственной вязкостью,  $M$  - это средневесовой молекулярный вес,  $K$  - константа, связанная с размерами связи цепи, и  $\alpha$  является константой, определяемой конфигурацией полимера. Константа  $\alpha$  для полимера, образующего статистический клубок, составляет  $0,5 < \alpha < 0,8$ , а для линейных полимеров составляет  $0,8 \cong \alpha < 1,8$ . Эта формула связывает вязкость раствора  $\eta$  с молекулярным весом " $M$ ". Для этого изобретения определение линейных полимеров дается таким, которые имеют значения  $\alpha \geq 0,8$ . Для жесткого стержневого полимера теоретический верхний предел составляет 1,8. Для данного молекулярного веса более высокая вязкость раствора будет получаться для полимеров с линейной конфигурацией, по сравнению с теми полимерами, которые существуют в виде статистического клубка. Другое соображение состоит в том, что значение  $\alpha$  является функцией использованного растворителя.  $\alpha$  для данного водорастворимого полимера может быть различной при различных концентрациях соли. Для этого изобретения концентрация соли устанавливается на уровнях, присутствующих в сыворотке крови (пример 80 г/л NaCl, 4 г/л KCl).

Термины "монодисперсный" и "полидисперсный" олигомеры (и подобные термины) относятся к распределению олигомеров в образце. Полидисперсность в образце определяется отношением средневесового молекулярного веса,  $M_w$ , к среднечисловому молекулярному весу,  $M_n$  (смотрите G, Odian, Principles of Polymerization 4th ed, pp.20-25, John Wiley & Sons, 1981). Для целей этого изобретения, "грубо полидисперсные" образцы олигомера представляются  $M_w/M_n = 1,3$  (смотрите фиг. 1). Для целей этого изобретения олигомер является "узко полидисперсным" олигомером, когда  $M_w/M_n = 1,0$  до 1,3 (смотрите фиг. 2), предпочтительно от 1,0 до 1,2 и более предпочтительно, от 1,0 до 1,15. Узко полидисперсный олигомер получали из грубо полидисперсной смеси олигомеров. Для целей этого изобретения олигомер является "монодисперсным" олигомером, когда  $M_w/M_n = 1,0$  до 1,1 (смотрите фиг. 4), которое представляет более узкий диапазон в пределах узко полидисперсного. Термин "узкий диапазон молекулярного веса" относится к снижению отношения полидисперсности на какую-то величину по сравнению с предшествующим образцом.

Термин "жесткий каркас" означает, что повторяющаяся единица, также называемая повторной единицей, состоит, преимущественно, из групп, которые ограничивают вращение на расстоянии от оси цепи. Например, *p*-фениленовые и амидные группы - (C(O)-NH-) легко не поворачиваются на расстоянии от оси цепи. Ограниченное число повернутых групп имеют допустимое отклонение по оси цепи, такие как *m*-фенилен и мочевины. Олигомеры настоящего изобретения, предпочтительно, имеют такой жесткий каркас.

Чистота каждой монодисперсной фракции из любой желаемой *n* фракции составляет, по крайней мере, 75%, предпочтительно, от примерно 85 до примерно 100%. Чистота определяется как отношение площади желаемого олигомера к площади всех пиков, наблюдаемых при анализе с помощью ВЭЖХ.

Использованный здесь термин "олигомер" включает в себе все возможные значения для  $n$ , например, с 3 до 50. Олигомеры являются, предпочтительно, линейными с  $n$ , равным целому числу от 3 до 50, предпочтительно от 3 до 15, более предпочтительно от 5 до 10, наиболее предпочтительно, с 6 до 9. Конечно, молекулярный вес прямо связан со значением  $n$  полученного в результате олигомера. Существенно, что эти олигомеры имеют достаточно низкий молекулярный вес для того, чтобы проходить через экскреторную мембрану почек, но способны подавлять ВИЧ.

Для целей настоящего изобретения олигомеры, описанные здесь, и их физиологически приемлемые соли считаются эквивалентными. Физиологически приемлемые соли относятся к солям тех оснований, которые будут образовывать соль с, по крайней мере, одной кислотной группой из групп R1 и которые не будут вызывать значительных побочных физиологических эффектов при введении, которое описано здесь. Подходящие основания включают, например, гидроксиды щелочных и щелочноземельных металлов, карбонаты и бикарбонаты, такие как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, карбонат калия, бикарбонат натрия, карбонат магния и тому подобные, аммиак, первичные, вторичные и третичные амины и тому подобное. Особенно предпочтительными основаниями являются гидроксиды щелочных металлов, карбонаты и бикарбонаты.

Физиологически приемлемые соли могут получаться при помощи общепринятых ионообменных процессов или путем обработки кислоты R1 соответствующим основанием. Примеры дополнительных солей здесь описаны.

Препараты настоящего изобретения представлены в твердой и жидкой форме. Эти препараты могут быть в форме набора, так что компоненты смешиваются в соответствующее время перед применением. Для предварительно смешанных или в

виде комплекта препаратов обычно необходим фармацевтически приемлемый носитель или адъювант.

Олигомеры настоящего изобретения растворимы в воде и в растворах солей, особенно с физиологическим pH и в физиологических растворах. Таким образом настоящие олигомеры легко получают в виде удобной водной фармацевтической дозированной формы. К тому же, после введения настоящего олигомера он остается растворенным и *in vivo*.

Предпочтительными значениями для ранее описанных формул с I по IV являются следующие:

R и R<sup>3</sup> являются 4-метилфенильной группой,

m = 1,

n = 3 - 15,

R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> являются водородом,

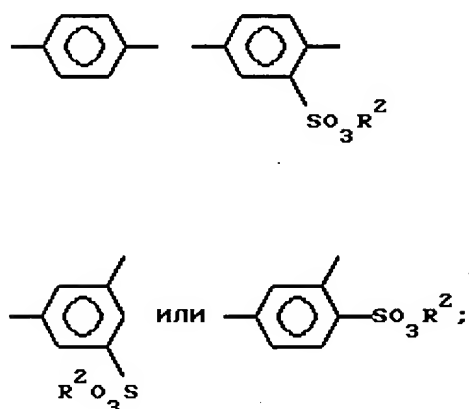
R<sup>6</sup> является фенилом,

R<sup>7</sup> является бензоилом,

X<sup>1</sup> является 4-метилфенильной группой,

X<sup>2</sup> является -CO<sub>2</sub>-(4-метилфенил)-группой,

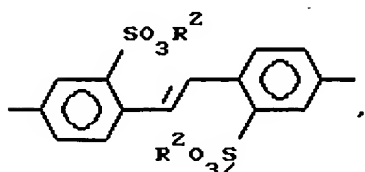
$X^3$  представляет собой



X представляет собой (см. фиг. 12)

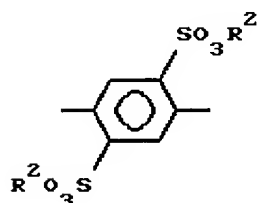
Особенно предпочтительными являются полимочевины с формулой I, где R и  $R^3$  являются 4-метилфенильными группами,  $m = 1$ ,  $n = 3 - 15$ , X представляет собой (см. фиг.13) и  $R^2$  дано определение ранее. Конкретными примерами таких полимочевин являются:

StOS/P/T = поли[имино(3-сульфо-1,4-фенилен)-1,2-этендиил-(2-сульфо-1,4-фенилен) аминокарбонил] , альфа - {[ (4-метилфенил)амино]-карбонил}-омега-[(4-метилфенил)-амино] - и представлен формулой I, выше, когда R и  $R^3$  являются 4-метилфенилами,  $R^2$  является водородом, X является



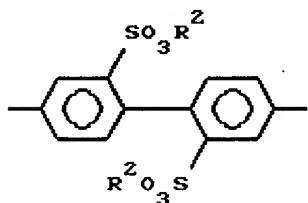
PDS /P/T= поли[имино(2,5-дисульфо-1,4-фенилен)иминокарбонил] , альфа{ [(4-

метилфенил)амино] карбонил} -омега-[(4-метилфенил)амино] - и представлен формулой I, выше, когда R и R<sup>3</sup> являются 4-метилфенилами, R<sup>2</sup> является водородом, X является



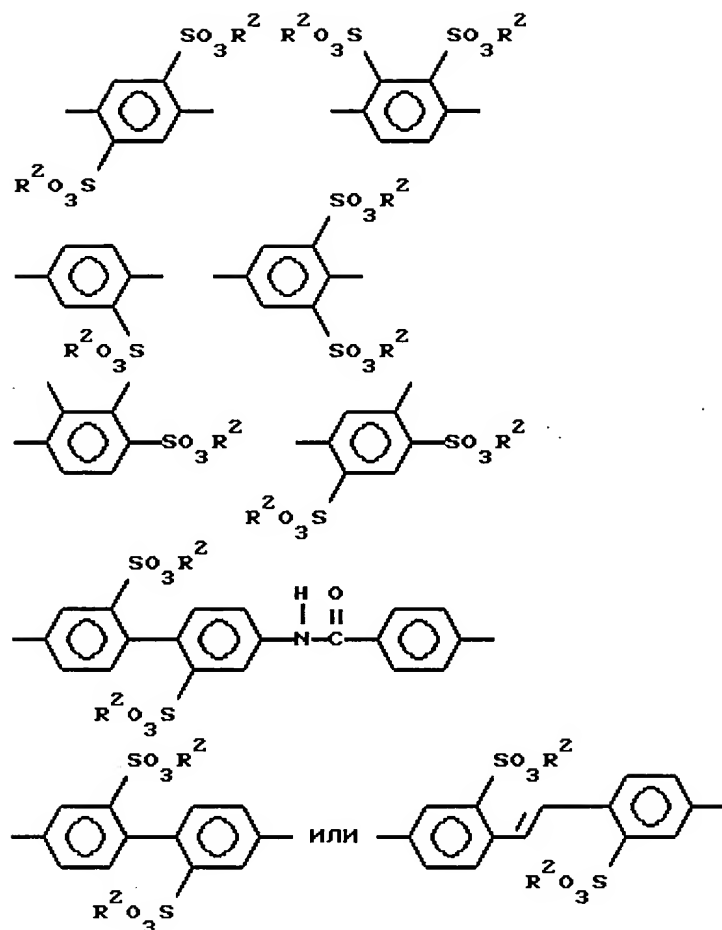
BPDS/P/T= поли{ имино[2,2'-дисульфо(1,1'-бифенил)-4,4'-диил} - иминокарбонил/, альфа-[[ (4-метилфенил)амино]-карбонил}-омега- [(4-метилфенил)амино]- и представлен формулой I, когда

R является 4-метилфенилом, R<sup>2</sup> является водородом, X является



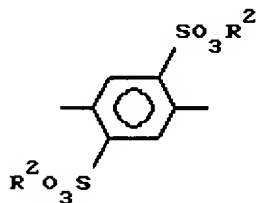
и особенно, когда n = 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

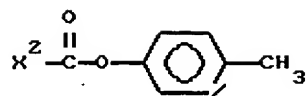
Особенно предпочтительны поликарбонаты с формулой II, где X<sup>1</sup> является 4-метилфенилом, X<sup>2</sup> является -CO<sub>2</sub>-(4-метилфенил), n = 3 - 15, и X является



Конкретными примерами таких поликарбонатов являются:

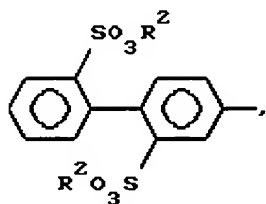
HBDS/P/C= поли[окси(2,5-дисульфо-1,4-фенилен)оксикарбонил] , альфа-[(4-метилфенокси)-карбонил] -омега-(4-метилфенокси)- и представлен формулой II, выше, когда  $\text{X}^1$  является 4-метилфенилом,  $\text{R}^2$  является водородом, X является



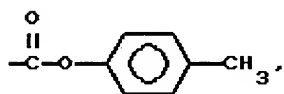


и  $n = 3 - 15$ .

НВРДС/Р/С = поли{окси[2,2'-дисульфо(1,1'-бифенил)-4,4'-диил]-оксикарбонил},  
 альфа-[(4-метилфенокси)карбонил]-омега-(4-метилфенокси)- и представлен  
 формулой II, выше, когда  $X^1$  является 4-метилфенилом,  $R^2$  является водородом,  $X$   
 является



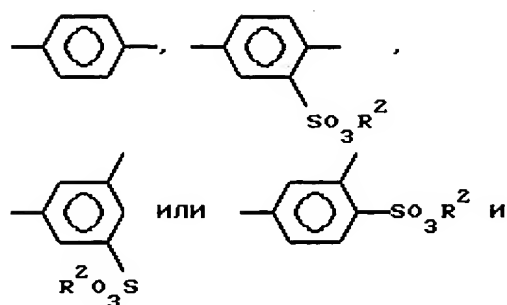
$X^2$  является



и  $n = 3 - 15$ .

Особенно предпочтительны полиэфиры с формулой III, где  $R^4$  и  $R^5$  являются  
 водородом,  $n = 3 - 15$ ,  $X^3$  представляет

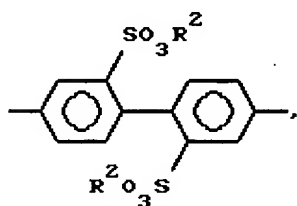




X представляет собой (см. фиг. 14)

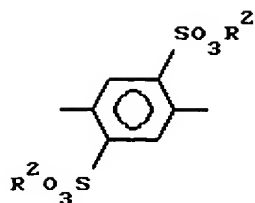
Конкретными примерами таких полиэфиров являются:

НBPDS/TPC = поли{окси[2,2'-дисульфо(1,1'-бифенил)-4,4'- диил]-оксикарбонил-1,4-фениленкарбонил} - и представлен формулой III, выше, когда  $\text{R}^4$  и  $\text{R}^5$  являются водородом,  $\text{X}^3$  является п-фениленом, X является



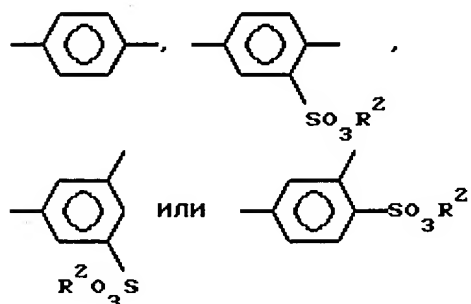
и  $n = 3 - 15$ .

НBDS /TPC = поли[окси(2,5-дисульфо-1,4-фенилен)-оксикарбонил-1,4-фениленкарбонил] - и представлен формулой III, выше, когда  $\text{R}^4$  и  $\text{R}^5$  являются водородом,  $\text{X}^3$  является п-фениленом, X является



и  $n = 3 - 15$ .

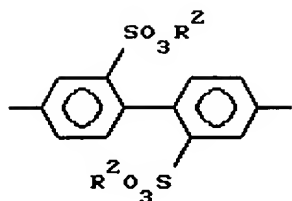
Особенно предпочтительны полиамиды с формулой IV, где  $R^6$  является фенилом,  $R^7$  является метилбензоилом,  $n = 3 - 15$ ,  $X^3$  представляет собой



и  $X$  представляет собой (см. фиг. 15).

Конкретными примерами таких полиамидов являются:

BPDS/TPC/MBC = поли{ имино[2,2'-дисульфо(1,1'-бифенил)- 4,4'-диил]иминокарбонил-1,4-фениленкарбонил}, альфа-{[(4-метилфенил)-амино]карбонил}-омега-[(4-метилфенил)амино] - и представлен формулой IV, выше, когда  $R^6$  является  $R-C(O)-NH-X-NH-$ ,  $R$  является 4-метилфенилом,  $R^2$  является водородом,  $R^7$  является 4-метилбензоилом,  $X^3$  является  $p$ -фениленом,  $X$  является



и  $n = 3 - 15$ .

Настоящее изобретение относится к способу получения узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров, которые имеют узкий диапазон молекулярного веса, который делает возможным использование этих олигомеров в качестве фармацевтических средств, особенно у людей, для лечения СПИД или КСС. Преимущества, полученные в результате наличия узкого интервала молекулярного веса у этих олигомеров, представляют собой более высокую активность, чем у соответствующих смесей, и лучшие характеристики олигомеров. Настоящее изобретение направлено на способ разделения вышеназванных олигомеров на их отдельные компоненты, например, с узким диапазоном молекулярного веса, и на полученный таким образом продукт выделенного олигомера.

При процессе получения узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров настоящего изобретения могут выполняться разные стадии следующим образом. Стадия I - ограничения грубой смеси полидисперсного анионного олигомера до узкополидисперсной смеси анионного олигомера - может осуществляться путем гельфильтрации, селективного осаждения, мембранного разделения или с помощью хроматографии с обращенной фазой, и/или

Стадия 2 - выделение монодисперсного анионного олигомера - может осуществляться с помощью электрофореза в геле или хроматографии с обращенной фазой. Монодисперсная чистота каждой желаемой  $n$  фракции составляет, по

крайней мере 75%, предпочтительно от примерно 85 до примерно 100%, и

Стадия 3 - по желанию, превращения соли узкополи- или монодисперсного анионного олигомера со стадии 1 или 2 в желаемую фармацевтически приемлемую соль, особенно натриевую или калиевую соль - может выполняться с помощью или ионного обмена, особенно когда образовывалась тетрабутиламмониевая соль, или путем добавления соли слабой летучей кислоты.

При процессе настоящего изобретения использованы обычные и известные в данной области техники методы. Все эти методики известны, некоторые примеры описаний этих методов могут быть найдены в нижеследующем:

Гельфитрация - "Protein Purification", ed. Charles R. Cantor, Springer - Verlag, 1987, в главе Robert K. Scopes, "Separation in Solution", pp. 186-198.

### **№2160746. Описание. Часть 2**

#### **Часть 1 Часть 2**

Избирательное осаждение - "Polymer Fractionation", ed. Manfred J.R., Cantow, Academic Press, 1967, в главе Akira Kotera, Fractional Precipitation, pp. 43-65.

Мембранное разделение - "Polymer Fractionation", ed. Manfred J.K. Cantow, Academic Press, 1967, pp. 462.

Хроматография с обращенной фазой - J. Chrom, Library, 41 A, "High-Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Bioligomers", ed. O. Mikes Elsevier, 1988, pp. A 127 - A 208, A 303 - A 399.

Электрофорез в геле - "Hotein Purification", ed. Charles. R. Cantor, Springer-Verlag, 1987, in the chapter by Robert K. Scopes "Separation in Solution", pp. 199-215.

Ионоообмен - "Dowex: Jon Exchange", The Dow Chemical Company, The Lakeside Press. 1958, pp. 39-66.

Добавление соли слабой летучей кислоты - олигомеры в растворе в виде аммониевых солей летучих аминов могут превращаться в более предпочтительные фармацевтически приемлемые соли, такие как натриевая или калиевая соли, путем обработки раствора солью щелочного металла и слабой летучей и кислоты. При

концентрировании раствора путем выпаривания или лиофилизации амин и слабая кислота удаляются, и олигомеры выделяются в виде их солей щелочных металлов. Соответствующими примерами солей аммония, которые могут превращаться на этой стадии, являются соли аммония, моноэтиламина, триэтиламина или диметиламина (здесь называемые "аммониевыми солями"). Примерами солей щелочных металлов являются натрия и калия гидроксид, бикарбонат, ацетат, формат или пропионат. Получение исходных материалов грубого полидисперсного анионного олигомера

Грубые полидисперсные анионные олигомеры, использованные в качестве исходных материалов в процессе настоящего изобретения для получения узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров настоящего изобретения, получают с помощью способа производства, описанного в Европейской заявке 0467185, опубликованной 22 января 1992 г. При процессе получения этих полидисперсных олигомеров используется модификация технологического процесса Kershner (Патент США N 4895660 и описанный далее ниже) путем замены части одного из бифункциональных мономеров монофункциональным веществом, блокирующим конец, и протекания реакции в отсутствие поверхностно-активного вещества. Среднечисловой молекулярный вес ( $M_n$ ) определяется стехиометрией реагирующих веществ.

Полидисперсные анионные олигомеры получают с помощью различных реакций, описанных ниже.

Полидисперсные полимочевины и полиамиды (формул I и III, выше)

Предпочтительный способ производства полидисперсных полимочевин и полиамидов формул I и III описан в данной области технологии (Kershner, патент

США 4824916) и, кроме того, объясняется в нижеследующем. Также описываются различные реагенты и условия.

Диамины: сюда включается широкое разнообразие ароматических диаминов. Круг возможных заместителей также широк и включает гидроксил, алкенил, низшие алкильные составляющие, карбоксилат, сульфонат и галогены. Заместители не являются обязательно анионоактивными при нейтральной pH в воде.

Дифункциональные электрофилы: фосген (карбонил дихлорид), карбонил дибромид,  $\text{Cl}_3\text{COCOC}_3\text{Cl}$ , карбонилдиимидазол,  $\text{Cl}_3\text{COCOC}_2\text{CCl}_3$ , дикислотные галогениды ароматических двухосновных кислот, таких как терфталевая, изофталевая, 2,6-нафалендиоевая кислоты.

Акцепторы кислоты: использовали несколько оснований, таких как карбонат натрия, гидроксид натрия и трибутиламин.

Разнообразные добавки: могут добавляться различные поверхностно-активные вещества. Подходящими поверхностно-активными веществами могут быть неионные, такие как сорбитана монолаурат, сорбитана моностеарат, этиленгликоля дистеарат, полиэтиленокси/полипропиленокси-полимер. Такие поверхностно-активные вещества могут быть трудноудаляемы из продукта, и поэтому использование поверхностно-активных веществ не является предпочтительным.

Растворители: при процессах с единственным растворителем применяются полярные апротонные растворители, такие как N,N-диметилацетамид и N,N-диметилформамид. Также применимы комбинация воды и второго растворителя, такого как толуол, тетрахлорид углерода, бензол, ацетон, этилендихлорид и тому подобное. Типичными соотношениями органического и водного растворителей являются примерно 0,5 к примерно 2.

При процессах, описанных в данной области, галогендиангидриды добавляются к перемешиваемому раствору или суспензии других

исходных материалов. В некоторых примерах во время добавления галогендиангидридов добавляется основание. Температура поддерживается между 0 и 50°C, предпочтительно от 20 до 30°C. Может использоваться соотношение реагентов (молярное отношение диамина к галогендиангидриду) от примерно 0,9 до 1,2, с предпочтением, по существу, эквимольных количеств.

Реакционная смесь перемешивается со скоростью, достаточной для достижения перемешивания реагентов. Скорость реакции зависит частично от площади межфазной поверхности, и поэтому предпочтительно энергичное перемещение. Для этой цели могут использоваться промышленные смесители.

Процесс, использованный для получения полидисперсных полимочевин, является модификацией процесса, описанного выше.

**Диамины:** Диамины настоящего изобретения являются первичными ароматическими, с формулами, описанными в предыдущих разделах. Такие диамины замещены по крайней мере одной группой, которая имеет заряд при нейтральной реакции, предпочтительно сульфонатом. Допустимы моновалентные алифатические заместители. Можно использовать небольшой набор алифатических связывающих групп, которые связывают вместе ароматические радикалы, такие как транс-замещенные этилен и ацетилен. Предпочтительными диаминными являются диамины, в которых связи углерод-азот усилены, так как являются параллельными, такие как 2,5-диамины-1,4-бензолдисульфоновая кислота (PDS), 4,4'-диамино-(1,1'-бифенил)-2,2'-дисульфоновая кислота (BPDS), транс-2,2'-(1,2-этендиил)бис(5-аминобензолсульфоновая кислота) (StDS) и 2,5-диаминобензолсульфоновая кислота.

**Дифункциональные электрофилы:** Для получения полимочевин могут использоваться фосген (дихлорид карбонила) и карбонила дибромид и другие

предшественники мочевины, такие как карбонилдиимидазол, гексахлорацетон,  $\text{Cl}_3\text{COCO}_2\text{CCl}_3$ ,  $\text{CCl}_3\text{COCl}$  и  $\text{Cl}_3\text{COCOC}_2\text{H}_5$ .

Акцепторы кислот: Можно использовать ряд неорганических оснований, таких как гидроксиды, карбонаты, бикарбонаты, фосфаты щелочных металлов или дивалентных металлов. Акцепторы кислот с буферными свойствами предпочтительны, когда все основание добавляется перед добавлением бифункционального электрофила. Органические основания, такие как триалкиламины, могут использоваться, но они не предпочтительны.

Монофункциональное блокирующее конец вещество: Можно использовать ряд таких средств, ограничивающих молекулярный вес. Такие вещества могут быть алифатическими или ароматическими соединениями, которые реагируют с диаминами или бифункциональными электрофилами. Примерами подходящих монофункциональных веществ являются амины, такие как анилин, метиланилин, метиламин, этиламин, бутиламин, диэтиламин, аммиак, N-метиланилин, фенол и крезол. Примерами монофункциональных реагирующих с аминами веществ являются бензоилхлорид, ацетилхлорид и фенилхлорформат. Эти блокирующие конец соединения могут также содержать заряженные заместители, например, калий-2-сульфофенол или калий-4-сульфоанилин.

Разнообразные добавки: Добавление поверхностно-активных веществ не является необходимым или предпочтительным и может осложнять процесс выделения.

Растворители: Предпочтителен единственный растворитель, вода, когда бифункциональный электрофил является жидким при температуре реакции.

Примером такого дифункционального электрофила является фосген. Когда используются твердые водонерастворимые реагенты, желательно небольшое количество не смешиваемого с водой соразтворителя. Примерами таких не смешиваемых с водой соразтворителей являются хлороформ, тетрагидрофуран



углерода, толуол и метиленхлорид. Типичными отношениями органического растворителя к водному является 0 к 1, при предпочтительном 0 к 0,1. Процесс проводится при температурах, которые дают возможность пройти реакции, в типичном случае от примерно 0 до 100°C. Предпочтительными температурами являются от 0 до 25°C. Когда используются исходные материалы с низкой температурой кипения, например, фосген (т. к. 6°C), выгодно работать при температурах, равных или ниже температуры кипения. Давление не имеет большого значения, и в типичном случае, используется атмосферное давление. Для оптимального протекания процесса должен тщательно поддерживаться pH реакции. При низком pH (< 6) реакция идет очень медленно, в то время как при высоком pH (> 10) дифункциональный электрофил нестабилен, так как разрушается гидроксидом или другим основанием. При высоком pH может также наблюдаться деградация полимочевины. Предпочтительно, pH поддерживается между 7 и 9. Когда не используется блокирующее конец вещество, регулирование молекулярного веса может быть достигнуто тщательной корректировкой стехиометрии реагентов. Диамин или дифункциональный электрофил может использоваться в избытке, например, от 1 до 100% молярного избытка. Стехиометрия должна рассчитываться для любого из дифункциональных электрофилов, которые разрушаются путем гидролиза, перед реакцией с диамином. Например, когда используется при высоком pH, необходим большой избыток для компенсации быстрой реакции с гидроксидом, который его разрушает. Так как степень этой побочной реакции трудно контролировать, предпочтительно используется монофункциональное блокирующее конец вещество для регулировки молекулярного веса. Хотя для регулировки среднечислового молекулярного веса могут использоваться вышеупомянутые методики, продукты являются смесями полимеров с несколькими молекулярными весами, которые характеризуются их распределением.

Порядок добавления реагентов не является определяющим. Однако предпочтительный порядок состоит в добавлении в первую очередь дифункционального электрофила. Когда используются акцепторы кислот, которые не являются буферами, такие как гидроксиды, наиболее предпочтительно добавлять часть вначале, чтобы достичь желаемого pH, и затем добавить остаток одновременно с дифункциональным электрофилом.

И наконец, желательно проводить эти полимеризации при высоких концентрациях. Это снижает количество растворителя, которое должно быть удалено для выделения продукта. К тому же, в некоторых случаях продукт осаждается из реакционного раствора ближе к концу реакции, и может быть выделен простым декантированием растворителя. Большая часть неорганической соли, которая получается в результате реакции акцептора кислоты, удаляется при этом процессе. Концентрация не является решающим фактором и может составлять от 0,5 до 50 весовых %, выражающих вес диамина по отношению к весу растворителя.

Предпочтительный интервал составляет от 1 до 10 весовых %.

Грубый полидисперсный продукт можно выделять путем осаждения из реакционного раствора с помощью растворителя, который смешивается с водой, но является плохим растворителем для продукта. Примерами таких растворителей являются ацетон, метанол, этанол, изопропанол.

Поликарбонаты и полиэфиры (формулы II и IV, выше)

Использовался процесс, описанный ранее для полимочевин и полиамидов, со следующими исключениями: Вместо диаминов использовали дифенолы: подходящие ароматические дифенолы, содержащие по крайней мере один заместитель, которые являются анионными при pH 7. Эти дифенолы имеют структуры, идентичные структурам диаминов, за исключением того, что амины

заменены на гидроксильные группы. Возможно предварительно обработать диолы одним или двумя молями основания, для образования моно- или дифеноксидов. Некоторыми конкретными примерами являются дикалий-4,4'-дигидрокси(1,1'-бифенил)-2,2'-дисульфонат (HBPDS) и дикалий-2,5-дигидрокси-1,4-бензолсульфонат (HBDS).

Условия процесса являются значительно более определяющими, из-за нестабильности продуктов в водных растворах. Особое значение имеет контроль pH. При уровнях  $\text{pH} < 7$  скорость полимеризации очень мала, тогда как при высоких pH ( $> 9$ ) карбонатные и эфирные группы в полимере подвергаются гидролизу.

Предпочтительный интервал pH составляет от 7 до 8, и желательно использовать автоматический регулятор pH для его поддержания. Применимый интервал температур, при которых может проводиться полимеризация, является более узким, от 8 до 40°C, и предпочтительно, от 0 до 25°C.

После того как добавление дикислотного хлорида завершено, желательно выждать какое-то время, обычно от 15 до 120 минут, чтобы убедиться, что превращение исходных материалов завершено. Во время этого периода может быть добавлено дополнительное количество основания, но никогда нельзя давать pH повышаться выше ранее описанных пределов. Грубый полидисперсный продукт выделяется, как описано выше.

#### Способы применения

Настоящие узкополи- и монодисперсные анионные олигомеры могут использоваться для предотвращения образования синцития в клетках, инфицированных вирусом ВИЧ-1, или родственными вирусами. Анти-ВИЧ анионные олигомеры могут использоваться для лечения СПИД и КСС и других болезней, вызываемых ретровирусом ВИЧ-1 или другими родственными вирусами. Узкополи- и

монодисперсные анионные олигомеры этого изобретения могут использоваться в виде смеси, где отношение полидисперсности не больше 1, 3, или в виде монодисперсного олигомера, такого как олигомеры с избранными значениями и в частности с формулами с I по IV, или смеси веществ с более чем одной формулой, например, представленных формулой I и формулой II соединений, или в виде смесей с другими известными средствами для данного противовирусного применения, такими как 3'-азидо-3'-дезокситимидин (АЗТ).

Количество против-ВИЧ узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров, которое необходимо для предупреждения образования синцития у инфицированных ВИЧ клеток, может быть любым эффективным количеством. Экспериментально было определено, что против-ВИЧ анионные олигомеры при применении в концентрации 10 мкг/мл в водном препарате приводили к полному подавлению образования синцития, а также снижали наличие антигена p 24.

Количество против-ВИЧ анионных олигомеров, которое необходимо вводить для лечения СПИД, КСС или других заболеваний, вызываемых инфицированием ВИЧ, могут меняться в широких пределах в соответствии с конкретной использованной единицей дозирования, сроком лечения, возрастом и полом больного, которого лечат, природой и степенью заболевания, которое лечат, и другими факторами, хорошо известными работающим в области медицины. Кроме того, против-ВИЧ анионные олигомеры могут использоваться в сочетании с другими средствами, которые известны как полезные при лечении ретровирусных заболеваний, и средствами, которые, как известно, полезны для лечения симптомов и осложнений, связанных с заболеваниями и состояниями, вызываемыми ретровирусами.

Эффективное против ВИЧ количество анти-ВИЧ узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров, которые будут вводиться в соответствии с данным изобретением, будет, в основном, меняться от примерно 0,1 мг/кг до 500 мг/кг веса

тела больного и может вводиться один или более раз в день. Противовирусные анионные олигомеры могут вводиться с фармацевтическим носителем, при использовании общепринятых форм дозирования или перорально или парентерально.

Способность узкополи- или монодисперсных олигомеров этого изобретения действовать как противовирусные средства может быть продемонстрирована по их способности подавлять рост и репликацию вируса HSV. Используемый здесь термин "метод лечения герпесной вирусной инфекции" относится к больному, который инфицирован вирусом герпеса типа 1 или типа 2, и введению указанному больному эффективного против вируса количества узкополи- и монодисперсного соединения формул I-IV. Кроме того, также понятно, что термин "вирусная инфекция" относится к любому состоянию, характеризующемуся присутствием вируса в клетках или теле указанного больного.

Противовирусная активность олигомеров этого изобретения может оцениваться с помощью исследования на снижение бляшкообразования, которое ранее описано Tyms et. al., J. Antimicrobial chemotherapy, 8, 65-72 (1981). Вкратце, человеческие эмбрионные фибробластные клетки (MPC5) культивировали в 24-ячеечных платах в присутствии минимально необходимой среды Игла (МСИ), дополненной 10% плодной телячьей сыворотки. Когда клеточные монослои были полуслившимися, их заражали 30-50 бляшкообразующими единицами HSV 2, штаммом HG52 или HSV1, штаммом 17 i (Davison & Wilkie, J. General Virology, 55, 315-331 (1981)). В конце периода адсорбции в один час при комнатной температуре, инфицированные монослои покрывали МСИ, содержащей 2% плодной телячьей сыворотки, 0,5% агарозы, застывающей при низкой температуре, и противовирусное вещество в диапазоне концентраций. После 3 дней инкубации клетки фиксировали в 10% формалине в физрастворе и затем окрашивали 0,3% метиленовым синим. Линии

зависимости ответной реакции от дозы вычерчивали по среднему числу присутствующих бляшек в зависимости от  $\log$  концентрации вещества. 50% эффективную дозу ( $ED_{50}$ ) рассчитывали по анализу линейной регрессии. Применение узкополи- или монодисперсных анионных олигомеров этого изобретения для лечения инфекций, вызываемых у людей, имеет большое значение. Термин "герпесные вирусные инфекции" означает инфекции, вызываемые или вирусом герпеса типа 1 или вирусом герпеса типа 2. Термин "пациент", использованный здесь, взят для обозначения млекопитающих, таких как приматы, включая людей, овец, лошадей, крупный рогатый скот, свиней, собак, кошек, крыс и мышей.

Количество узкополи- или монодисперсного анионного олигомера формул с 1 до 4, которое нужно ввести, может изменяться в широких пределах в соответствии с конкретной использованной единицей дозирования, сроком лечения, возрастом и полом лечащегося пациента, природой и степенью заболевания, которое лечат, и конкретным выбранным анионным олигомером. Кроме того анионный олигомер может использоваться в сочетании с другими известными средствами, которые полезны при лечении HSV и CMV инфекций, и известными средствами, которые применимы для лечения симптомов и осложнений, связанных с заболеваниями и состояниями, вызываемыми вирусом. Эффективное против вируса герпеса и цитомегаловируса количество анионного олигомера формулы I, которое нужно вводить, будет в основном колебаться в пределах от примерно 15 мг/кг до 500 мг/кг. Единица дозирования может содержать от 25 до 500 мг анионного олигомера и может приниматься один или более раз в день. Анионный олигомер может вводиться с фармацевтическим носителем при использовании общепринятых дозированных форм или перорально, или парентерально, или местно.

Для перорального введения против-ВИЧ или против-HSV анионные олигомеры могут быть оформлены в твердые или жидкие препараты, такие как капсулы, пилюли, таблетки, пастилки, лепешки, сиропы, порошки, растворы, суспензии или эмульсии. Твердая дозированная форма может быть капсулами, которые могут быть обычными твердыми или мягкими желатиновыми капсулами, содержащими, например, поверхностно-активные вещества, смазывающие вещества и инертные наполнители, такие как лактоза, сахароза, сорбит, фосфат кальция и кукурузный крахмал. При другом осуществлении, анионные олигомеры этого изобретения могут таблетироваться с общепринятыми основами для таблеток, такими как лактоза, сахароза и кукурузный крахмал, в смеси со связывающими веществами, такими как аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатин, дезинтегрирующими средствами, предназначенными для того, чтобы помочь распаду и растворению таблетки после приема, такими как картофельный крахмал, альгиновая кислота, кукурузный крахмал и камедь гуары (guar), скользящими веществами, предназначенными для улучшения потока таблетированного гранулята и для предотвращения адгезии таблетированного материала к поверхности таблеточных штампов и пуансонов, например, тальком, стеариновой кислотой, стеаратами магния, кальция или цинка, красящими веществами, вкусовыми средствами, корригирующими средствами, предназначенными для повышения эстетических качеств таблеток и для того, чтобы сделать их более приемлемыми для пациента. Подходящие наполнители для использования в пероральных жидких дозированных формах включают: растворители, такие как вода и спирты, например, этанол, бензиловый спирт и полиэтиленгликоли с добавлением или без него фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, суспендирующего или эмульгирующего средства.

Противо-ВИЧ или противо-HSV узкополи- и монодисперсные анионные олигомеры этого изобретения могут также вводиться парентерально, то есть подкожно, внутривенно, внутримышечно или внутривентально, в виде инъектируемых доз анионных олигомеров в физиологически приемлемом растворителе с фармацевтическим носителем, который может быть стерильной жидкостью или смесью жидкостей, таких как вода, физраствор, водный раствор декстрозы и подобные растворы сахаров, спирт, такой как этанол, изопропанол или гексадециловый спирт, гликоли, такие как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, глицеролкетали, такие как 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол, эфиры, такие как поли(этиленгликоль)400, масло, жирные кислоты, эфир жирной кислоты или глицерид или ацетилованный глицерид жирной кислоты с добавлением или без него фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло или детергент, суспендирующего средства, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгирующего средства и других фармацевтических адъювантов.

Иллюстрациями для масел, которые могут использоваться в парентеральных препаратах этого изобретения, являются масла из нефти, животного, растительного происхождения или синтетические, например, арахисовое масло, соевое масло, хлопковое масло, кукурузное масло, оливковое масло, вазелиновое и минеральное масло. Подходящие жирные кислоты включают олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Подходящими эфирами жирных кислот являются, например, этилолеат и изопропилмиристат. Подходящие мыла включают соли жирных кислот и щелочных металлов, аммония и триэтаноламина, и подходящие детергенты включают катионные детергенты, например, диметилдиалкиламмонийгалогениды, алкилпиридинийгалогениды и ацетаты алкиламинов, анионные детергенты, например, алкил-, арил- и олефинсульфонаты,



сульфаты алкилов, олефинов, простых эфиров и моноглицеридов, и сульфосукцинаты, неионные детергенты, например, оксиды жирных аминов, алканоламиды жирных кислот и полиоксиэтилен-полипропиленовые сополимеры, и амфотерные детергенты, например, алкил-бета-аминопропионаты и 2-алкилимидазолиновые соли четвертичного аммония, а также смеси. Композиции для парентерального введения этого изобретения будут обычно содержать от примерно 0,5 до примерно 25% по весу против-ВИЧ анионного олигомера в растворе. Также с успехом могут использоваться консерванты и буферы. Чтобы свести к минимуму или устранить раздражение в месте инъекции, такие композиции могут содержать неионные поверхностно-активные вещества, имеющие гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) от примерно 12 до примерно 17. Количество поверхностно-активного вещества в таких препаратах колеблется в пределах от примерно 5 до примерно 15% по весу. Поверхностно-активное вещество может быть единственным компонентом, имеющим вышеназванный ГЛБ, или может быть смесью двух или более компонентов, имеющей желаемый ГЛБ. Показательными поверхностно-активными веществами, используемыми в парентеральных препаратах, являются принадлежащие к классу эфиров полиэтиленсорбитана и жирных кислот, например, сорбитанмоноолеат.

Узкополи- и монодисперсные анионные олигомеры этого изобретения могут также использоваться профилактически, то есть, чтобы предупредить передачу вируса от инфицированного индивидуума к неинфицированной мишени. Вирус распространяется частично при переливании крови, но может передаваться также и через другие жидкости организма. Таким образом, олигомеры этого изобретения могут включаться в препараты вместе со стандартными продуктами детергентов для использования при очистке, особенно в исследовательских и клинических лабораториях и в госпиталях, где обрабатываются продукты крови инфицированных

индивидуумов. Препараты, содержащие олигомеры настоящего изобретения, могут использоваться для мытья медицинского/хирургического оборудования и инструментов, а также рук и других кожных поверхностей работников здравоохранения. Олигомеры этого изобретения могут также наноситься в виде жидкой или порошковой композиции, на поверхность профилактических средств при сексе, таких как кондомы, или пользователем или производителем профилактического средства перед продажей. Олигомеры этого изобретения могут быть включены в состав композиций для спрыскивания для использования женщинами перед последующим сексуальным контактом с инфицированным индивидуумом. Олигомеры этого изобретения могут также включаться в состав смазок и сперматоцидных желе и лосьонов. И наконец, олигомеры этого изобретения могут также оформляться в композиции, которые будут добавляться в горячие ванны, водоворотные ванны и плавательные бассейны, чтобы инактивировать возможную активность вируса.

Изобретение будет далее разъяснено путем рассмотрения следующих примеров, которые предназначены быть просто иллюстративными для настоящего изобретения.

#### Определения

Терминам, использованным в настоящих примерах, дано определение в нижеследующем, если не сформулировано иначе, и для примера представляют образец подходящего оборудования или смол, но могут использоваться и сходное оборудование или смолы с отличающимися параметрами:

Диодный множественный детектор = 280 нм или 320 нм или 340 нм или 550 нм УФ с шириной полосы 4 нм или 100,

Колонка для гельфильтрации = Сефадекс G-25 колонка для гельфильтрации (3,0 см x 94 см),

ВЭЖХ = высокоэффективная жидкостная хроматография,

IC<sub>50</sub> = подавляющая доза, блокирующая 50% роста вируса,

Жидкостный хроматограф = Hewlett Packard™ 1090,

Мембранный фильтр с отсечкой 10000 дальтон = Centricon - 10 от Amicon;

Мембранный фильтр с отсечкой 3000 дальтон = Centricon-3 от Amicon;

MT4 = трансформированная клеточная линия человеческих Т клеток,

МТТ = тетразолиевый восстанавливающий реагент, 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид,

Перистальтический насос = Gilson Minipuls перистальтический насос,

б.е. = бляшкообразующая единица,

Колонка I для хроматографии с обращенной фазой = Alltech Hyperprep™ 1200,

Колонка II для хроматографии с обращенной фазой = Alltech Absorbosphere™ HS с

высоким заполнением углем C18,

RPMI 1640 = стандартная среда для клеточных культур, получаемая от GIBCO,

Колонка шприц-патрон = Alltech Max-Clean™ CX;

TCID<sub>50</sub> = инфицирующая доза для культуры ткани, т.е. количество культуральной жидкости, эффективное при инфицировании 50% клеток (50% вызывающий заболевание клетки эффект на 7 день после инфицирования), и

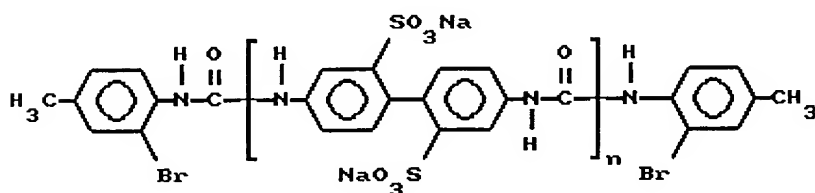
УФ детектор = модель ISCO UA-5 ультрафиолетового детектора.

Получение исходных материалов

Пример А: Блокирование конца бромом

4-горлую колбу оборудовали шприцевым вводом, ячейкой для термометра, механической мешалкой, рН электродом, холодильником с сухим льдом, входной трубкой для газа фосгена. В колбу загружали 8,00 г (23, 23 ммоль) 4,4'-диаминобифенил-2,2'-дисульфоновой кислоты, 0,961 г (5,162 ммоль) 2-бром-4-метиланилина и 250 мл воды. Колбу охлаждали до 12°C и перемешиваемую суспензию обрабатывали 11 мл 5М гидроксида натрия до тех пор, пока не растворялись все твердые вещества и рН достигало 11,5. К смеси в течение 10-минутного периода добавляли 4,5 г (45 ммоль) фосгена вместе с дополнительно 5М гидроксидом натрия для поддержания рН между 8 и 9. После 3-часового перемешивания дополнительно добавляли 1,848 г (9,93 ммоль) 2-бром-4-метиланилина вместе со 100 мл воды. Затем добавляли 3,7 г (37 ммоль)

дополнительного количества фосгена вместе с достаточным количеством 5М гидроксида натрия, чтобы поддержать pH между 8 и 9. Перемешивание продолжалось в течение ночи (примерно 16 ч), и затем содержимое осаждали в 1000 мл ацетона. Продукт отфильтровывали и промывали 3 раза 100 мл ацетона. Осадок с фильтра затем переносили в кристаллизатор и высушивали под вакуумом в течение ночи при 50°C, получая 11,249 г неочищенного не совсем белого порошка. Образовавшийся продукт имеет формулу



и грубую полидисперсность при  $M_w/M_n$ , равном примерно 1,4.

Пример В:

Способ получения неочищенных полидисперсных олигомеров с формулами I-IV были описаны в Европейской заявке 0467185, опубликованной 9 сентября 1992 г. Ограничение неочищенной смеси олигомеров до более узко полидисперсной смеси олигомеров; Стадия I

Пример I: Гельфильтрация

А:

А. Раствор в 8,34 мл воды 0,542 г неочищенной полидисперсной сульфонированной полимочевины формулы I из примера В исходных материалов, с числом средней

степени полимеризации, равным 9 (показано на фиг. 1,  $M_n = 2348$ ,  $M_w = 3408$ ,  $M_w/M_n = 1,45$ ), пропускали через колонку для гельфилтрации. Постоянный поток 5,0 мл/мин деионизированной воды поддерживали с использованием перистальтического насоса. Элюент контролировали с помощью УФ-детектора при 310 нм на присутствие смеси анионных олигомеров. Через 40 мин начинал появляться образец, и собирали 4 мл фракции. Анализ с помощью аналитической ВЭЖХ показал, что дисперсность каждой фракции была значительно снижена по сравнению с дисперсностью исходного материала. Например, фракция 14 (показана на фиг. 2) состояла из 25 мг олигомера с узкой дисперсностью ( $M_n = 2549$ ,  $M_w = 2880$ ,  $M_w/M_n = 1,13$ ). Фракции с 7 по 17 объединяли, чтобы получить 271 мг образца (показанного на фиг. 3,  $M_n = 2860$ ,  $M_w = 3830$ ,  $M_w/M_n = 1,34$ ) со сниженным количеством примесей с низким временем удерживания.

На фиг. 1 - 4 пики в промежутке времени с 0 до 3 мин представляет олигомеры без блока на конце, с 3 до 5 мин - представляет моноблокированные на конце олигомеры, с 5 до 14 мин представляет желаемые диблокированные на концах олигомеры с  $n = 1$  при 14 мин,  $n = 2$  при 13 мин,  $n = 3$  при 12 мин, и аналогично, считая  $n$  справа налево.

Вертикальная ось представляет УФ поглощение при 280 нм в миллиединицах абсорбции ("мЕА"). Концентрация образца не определялась, поэтому от образца к образцу изменения размера пика не имеют значения.

В:

Колонку для гельфилтрации подготавливали, давая 115 г смолы Pharmacia Sephadex<sup>TM</sup> G-10 (40-120 мкм размер гранул) набухнуть в примере 500 мл дистиллированной воды в течение одного часа. Пылевидная часть декантировалась со смеси смолы, после этого как суспензии давали отстояться в однолитровом

цилиндре. Стеклянную колонку заполняли суспензией смолы и пропускали 500 мл дистиллированной воды через колонку, получая в результате слой 2,5 x 50 см. Постоянная скорость потока через колонку поддерживалась использованием перистальтического насоса (скорость потока примерно от 3 до 4 мл/мин). Элюент контролировали с помощью УФ-детектора при 310 нм на присутствие продукта смеси более узко полидисперсных анионных олигомеров.

Раствор 50 мг полидисперсной анионной полимочевины формулы I из примера В исходных материалов с  $M_n$  2730, как определено с помощью  $^1\text{JMP}$ , растворяли в 2,5 мл дистиллированной воды и вносили сверху на колонку. Материал элюировали дистиллированной водой, и собирали три фракции по 25 мл в каждой. Анализ фракций с помощью ВЭЖХ показал, что фракция 1 была обогащена олигомерами с высоким молекулярным весом, тогда как фракции 2 и 3 были обогащены олигомерами с более низким молекулярным весом относительно исходного материала.

С:

Раствор неочищенной смеси, 1,078 г в 10 мл воды, полученного ранее, заблокированного на конце бромом продукта из примера А исходных материалов, пропускали через гельфильтрационную колонку. Постоянный поток 5 мл/мин деионизированной воды поддерживали с помощью перистальтического насоса. Элюент контролировали с помощью УФ-детектора при 310 нм на присутствие смеси олигомеров. Через 40 минут начинал появляться образец, и собирали фракции по 3 мл. Анализ с помощью аналитической ВЭЖХ показал, что дисперсность каждой из фракций была значительно снижена по сравнению с дисперсностью исходного материала. Фракции с 8 по 11 объединяли для получения примерно 300 мг образца, заблокированного на концах бромом, со сниженным количеством примесей с низким

временем удерживания. Итак, был выделен блокированный на концах бромом полидисперсный олигомер с улучшенной чистотой.

#### Пример 2: Избирательное осаждение

Готовили раствор в 40,0 мл воды 3,93 г смеси неочищенных полидисперсных сульфонированных полимочевин формулы I из примера В исходных материалов с числом средней степени полимеризации, равным 6. К этому раствору добавляли 40,0 мл ацетона, вызывая образование осадка, который отделялся центрифугированием. Растворенную часть выпаривали, чтобы получить 0,82 г фракции с узкой полидисперсностью, имеющую среднюю степень полимеризации примерно 4.

#### Пример 3: Мембранное разделение

167 мкл раствора с концентрацией 10 мг/мл неочищенной смеси полидисперсных сульфонированных мочевины с формулой I из примера В исходных материалов с числом средней степени полимеризации, равным 6, пропускали через мембранный фильтр с отсеканием веществ с 10000 дальтон, используя центрифугу. Часть, которая проходила через этот фильтр, аналогично фракционировали, используя мембрану с отсеканием в 3000 дальтон. Эта последовательность разделений дает выход смеси олигомеров, в которой дисперсность каждой из фракций была значительно снижена по сравнению с дисперсностью исходного материала, и части низко- и высокомолекулярные, по сравнению с желаемой степенью полимеризации, отсутствовали. Верхняя линия фиг. 5 показывает неочищенную полидисперсную полимочевину формулы I, и вторая линия - материал, прошедший через фильтр с отсеканием 10000 дальтон, но оставшийся на фильтре, отсекающем 3000 дальтон.



#### Пример 4: Хроматография с обращенной фазой

Жидкостный хроматограф, оборудованный диодным множественным детектором (280 нм), модифицировали с помощью 1250 мкл петли для образца. Использовали колонку для хроматографии с обращенной фазой (9,4 см x 50 мм), заполненную частицами в 10 мкм. Раствор в 2,65 мл воды 3,8 г неочищенной смеси полидисперсной сульфонированной полимочевины формулы I из примера В исходных материалов, с числом средней степени полимеризации, равным 6, вводили частями по 200 мкл. При использовании постоянного соотношения двух элюентов, 5 мМ водного  $(n\text{-Bu}_3\text{N})\text{PO}_4$  и ацетонитрила 45:55 (объем/объем) наблюдался широкий пик, который фракционировали вручную. Каждая из фракций анализировалась с помощью ВЭЖХ, и как было показано, являлась смесью олигомеров с полидисперсностью более узкой, чем полидисперсность грубого исходного материала.

Выделение монодисперсного олигомера в виде его аммониевой соли. Стадия 2

#### Пример 5: Хроматография с обращенной фазой

А:

Жидкостный хроматограф, оборудованный диодным множественным детектором (320 нм), модифицировали с помощью 250 мкл петли для образца. Использовали колонку для хроматографии с обращенной фазой (10 мм x 250 мм), заполненную 3 мкм частицами. Раствор в 18,0 мл воды 905,2 мг неочищенной смеси полидисперсной сульфонированной полимочевины с формулой I из примера В исходных материалов с числом средней степени полимеризации, равным 6, вводили

частями по 200 мкл. Элюентом, накачиваемым со скоростью 1,5 мл/мин, был раствор водного 5 мМ  $\text{Et}_3\text{NHOAc}$ , ацетонитрила и тетрагидрофурана. Стартовое соотношение трех компонентов было 80:20:0 (об/об/об) и линейно изменялось до тех пор, пока при 21,5 мин не становилось 70:30:0 (об/об/об) и линейно изменялось, пока на 27 мин не становилось равным 30:40:30 (об/об/об), которое держалось постоянным до 36 мин, момента, когда протекание прекращалось. Через 5 минут вводили дополнительный образец. Элюент собирали, используя коллектор фракции. После 24 час непрерывного элюирования фракции анализировали. Было получено несколько фракций, содержащих олигомеры (в области 85 до 100 процентов чистоты), в от 2 до 9 повторностях. Эти фракции выпаривали при примерно 20 мм ртутного столба и 50-55°C и затем высушивали в течение ночи в вакуумном шкафу при 50°C. Получали триэтиламмониевые соли полимочевины в виде легких стекловидных частиц янтарного цвета.

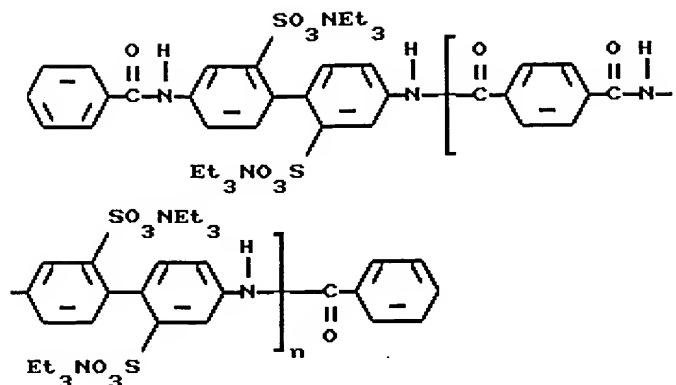
В:

Жидкостный хроматограф, оборудованный диодным множественным детектором (320 нм), модифицировали с помощью 250 мкл петли для образца. Использовали колонку для хроматографии с обращенной фазой 11 (10 мм x 250 мм), заполненную 3 мкм частицами. Раствор грубой смеси из примера 1С разбавлялся 5 мл воды и фильтровали. Использовался 75 мкл объем для введения. Элюент подавался насосом со скоростью 1,5 мл/мин и представлял собой раствор водного 50 мМ  $\text{Et}_3\text{NHOAc}$  и ацетонитрила. Соотношения двух компонентов в начале были равны 70:30 (об/об), оставались постоянными в течение 10 мин и линейно изменялись, пока не достигали 60:40 (об/об) в 15 мин, когда соотношение поддерживалось постоянным до 25 мин, момента, в который протекание прекращалось. Через 5 минут вводили дополнительный образец. Элюент собирали, используя коллектор

фракций. После 24 ч непрерывной работы реакции анализировали. Получали девять фракций, содержащих олигомеры (с чистотой в области 95 - 100%) в от 1 до 9 повторностях. Эти фракции выпаривали при 20 мм рт.ст. при 50 - 55°C и затем высушивали в течение ночи в вакуумном шкафу при комнатной температуре. Получали триэтиламмониевые соли монодисперсной полимочевины,  $M_w/M_n =$  меньше 1,1, в виде легких янтарных стекловидных частиц с выходом 5 - 10 мг.

C:

Жидкостный хроматограф, оборудованный диодным множественным детектором (340 нм), модифицировали с помощью 250 мкл петли для образца. Использовали колонку II для хроматографии с обращенной фазой (10 мм x 250 мм), заполненную 7 мкм частицами. Раствор 200 мг неочищенной смеси полиамида с формулой IV ( $M_n =$  примерно 1300), полученный аналогично примеру IC, разбавляли 3 мл воды и фильтровали. Использовался 75 мкл объем для введения. Элюент, подаваемый насосом со скоростью 1,0 мл/мин, представлял собой раствор водного 50 мМ  $Et_3NHOAc$  и ацетонитрила. Отношение двух компонентов составляло 72:28 (об/об). Элюент собирали, используя коллектор фракций. После 24 ч непрерывной работы фракции анализировали. Получали фракции, содержащие олигомеры в от 1 до 4 повторностях. Эти фракции выпаривали при примерно 20 мм рт.ст. при 60°C и затем высушивали в течение ночи в вакуумном шкафу при 50°C. Получали триэтиламмониевые соли монодисперсного полиамида в виде твердого белого вещества. Образовавшийся продукт имеет формулу



Если разделение протекало в присутствии  $\text{Et}_3\text{NHOAc}$ , длина цепи олигомера снижалась с увеличением времени удерживания, тогда как получался обратный порядок элюирования, если разделение проводилось в присутствии тетрабутиламмоний-фосфата, т.е. длина цепи увеличивается с повышением времени. Фиг. 6 показывает профиль ВЭЖХ с  $\text{Et}_3\text{NHOAc}$ . Фиг. 7 показывает профиль ВЭЖХ с тетрабутиламмонийфосфатом. Фиг. 8 показывает профиль ВЭЖХ очищенных монодисперсных компонентов с фиг. 6.

Получали другие хроматограммы ВЭЖХ с тетрабутиламмония фосфатом.

Различные фракции олигомеров полимочевины формулы I показаны на фиг. 8. На фиг. 8 верхняя линия представляет исходный материал неочищенного полидисперсного олигомера. Длина цепи компонентов увеличивается с увеличением времени удерживания (согласующийся с фиг. 7). Вторая линия представляет олигомер после ограничения неочищенной смеси анионных олигомеров до более узко полидисперсной смеси анионных олигомеров способом из примера 3, путем применения мембранных фильтров для ограничения распределения размеров интервалом между 3000 и 10000 дальтон. Отдельные фракции олигомеров собирали и затем подвергали ВЭЖХ с тетрабутиламмония фосфатом с получением результатов, которые показаны в других отдельных профилях фиг. 8, где показано

каждое отдельное монодисперсное вещество с  $n = 1 - 9$ . Последний профиль на фиг. 8 показывает смесь олигомеров с  $n = 10 - 13$ .

Превращение аммониевой соли олигомера в соответствующую натриевую соль.

Стадия 3

Пример 6: Ионный обмен

А:

Образцы из примера 5 индивидуально растворяли в примерно 2 мл деионизированной воды и пропускали через колонки шприц-патроны, которые были заполнены 0,5 мэкв сульфонированного перекрестно-связанного полистирола в кислотной форме. Колонку дважды промывали 1 мл воды. После выпаривания все образцы анализировали с помощью протонного ЯМР, который показал, что ион триэтиламмония полностью удалялся и заменялся водородом.

Образцы, содержащие олигомеры с более чем одним повторением единицы, были смесью диастереомеров. Хотя эти фракции, по-видимому, состоят из единственного вещества, они в действительности являются изомерными смесями диастереомеров, которые являются результатом хиральной природы бифенольной группы в повторяющейся единице. Типичный анализ ВЭЖХ показан на фиг. 4 ( $M_v = 2950$ ,  $M_n = 2800$ ,  $M_v/M_n = 1,05$ ), который показывает, что преобладает единственный пик. В этом образце небольшие пики времени удерживания в начале являются сериями моноблокированных олигомеров, которые получаются в результате гидролиза основного компонента во время выделения.

$M_n$  олигомеров рассчитывали путем сравнения интегрирования области метильной группы на концах с таковым ароматической области с помощью  $^1H$  ЯМР. Избранные

образцы также анализировали по времени пролета масс-спектропии, которая подтверждала определения ЯМР.

В:

Колонки шприц-патроны, которые заполнены 0,5 мэкв сульфонированного перекрестно-связанного полистирола в кислотной форме, обрабатывали 2 мл 5 М NaCl и промывали 5 мл воды. Образцы из примера 5В индивидуально растворяли в примерно 2 мл деионизированной воды и пропускали через эти колонки для обмена  $\text{Et}_3\text{NH}^+$  катиона на  $\text{Na}^+$ . Колонку дважды промывали 1 мл воды. После выпаривания все образцы анализировали с помощью протонного ЯМР, который показал, что ион триэтиламмония был удален. Избранные образцы также анализировали с помощью времени пролета масс-спектропии, которая подтверждала определение ЯМР.

С:

Колонки шприц-патроны использовали, как описано в примере 6А, для превращения триэтиламмониевых катионов полиамида из примера 5С в соответствующие натриевые соли.

Пример 7. Добавление солей слабых летучих кислот

Лиофилизированные полимочевинные олигомеры формулы I (полученные из BPDS и толуидина и выделенные с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием  $\text{Et}_3\text{NHOAc}$  буфера) растворяли в деионизированной воде и обрабатывали ацетоном натрия. Эквивалент ацетата натрия добавляли на эквивалент сульфоната в олигомере. Раствор лиофилизировали в течение 20 ч, чтобы удалить воду, триэтиламин и уксусную кислоту.

Фракцию олигомера с  $n = 9,63$  мг растворяли в 10 мл воды и 195 мкл 1,1 М раствора ацетата натрия (NaOAc). Раствор лиофилизировали, и получали 57 мг олигомера.

Подобным же образом фракцию олигомера с  $n = 7,82$  мг растворяли в 10 мл воды и 250 мкл 1,1 М раствора NaOAc. Раствор лиофилизировали и получали 79 мг олигомера.

Фракцию олигомера с  $n = 5,162$  мг растворяли в 10 мл воды и 277 мкл, 1,1 М раствора NaOAc. Раствор лиофилизировали и получали 144 мг олигомера.

#### Биологические данные

Пример I. Способность различных анти-ВИЧ-олигомеров предотвращать вызываемую вирусом гибель клеток при использовании клеток MT4 и штамма ВИЧ-1 RF.

Противовирусную активность различных монодисперсных олигомеров полимочевины формулы I определяли стандартным испытанием на восстановление тетразолия (Nakashima et al., J. Virol Methods 26, 319-330 (1989)). Олигомеры растворяли в PPMI в стандартной концентрации (примерно 100 мкг/мл) и затем исследовали на противо-ВИЧ активность, делая разведение растворов в два раза по 96-ячеечной микротитровальной плате. Затем в каждую ячейку добавляли  $5 \cdot 10^4$  клеток MT4 и 100 TCID<sub>50</sub> вируса (ВИЧ-1, штамм RF), и платы инкубировали при 37°C в течение 7 дней. В каждую ячейку добавляли МТТ и платы инкубировали в течение дополнительных 2 ч. Синие кристаллы формазана растворяли с применением кислого изопропанола и измеряли поглощение при 540 нм. Результаты представлены в таблице I.

Пример II. Возможность обрабатывать клетки различными олигомерами и блокировать ВИЧ-1 инфицирование при использовании клеток JM и штаммов GB8 ВИЧ-1

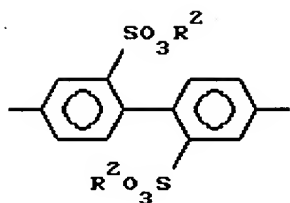
Противовирусную активность различных монодисперсных олигомеров полимочевины формулы I определяли стандартной пробой образования синцития (Cardin et al., Trans. Assoc. Amer. Phys. C. 101-109 (1989) и Cardin et al., J.Biol. Chem. , 266, 13355 - 13363 (1981)). Клетки JM обрабатывали при 37°C различными веществами при разных концентрациях (мкг/мл) или оставляли необработанными. Клетки в среде RPMI инфицировали ВИЧ-1 (GB8) в течение 2 ч при комнатной температуре. Клетки затем два раза промывали средой RPMI и ресуспендировали в свежей среде, содержащей фракционированные олигомеры перед распределением в sdвоенные ячейки, и инкубировали при 37°C. Через 3 дня подсчитывали образование синцития. Результаты представлены в таблице II

Фиг. 9 показывает гистограмму IC50 противовирусных концентраций различных фракций олигомера. Противовирусная активность усиливается с увеличением длины цепи олигомера вплоть до  $n = 9$ . Противовирусная активность полидисперсной фракции и смеси фракций с  $n = 10 - 13$  была примерно одинаковой, но обе эти фракции были менее активны, чем каждая из фракций с  $n = 6$  по  $n = 9$  из монодисперсных фракций олигомеров.

Пример III: Действие узкополидисперсных и монодисперсных полимочевин с формулой I на репликацию HSV-2

Клетки vero выращивали до слияния в 24-ячеечной плате для культивирования ткани. Клетки инфицировали HSV-2 при множественности инфицирования в 50 бое/ячейку. Инфицирование осуществлялось или в присутствии или в отсутствие различных концентраций вещества, которое является BPDS /P/T и называется поли{имино[2,2'-дисульфо-(1,1'-бифенил)-4,4'-диил]иминокарбонил}, альфа-{ [(4-метилфенил)амино] -карбонил} -омега-[(4-метилфенил)амино]- и представлен формулой I в пункте 1 формулы изобретения, когда R является 4-метилфенилом, R<sup>2</sup> является водородом, X является





и  $n$  определяется, как установлено в таблице II. После 2 ч абсорбции при комнатной температуре, заражающая жидкость удалялась, и клетки инкубировали с покрывающим слоем агарозы, содержащей соответствующие концентрации вещества. После 2 дней при 37°C клетки фиксировали и окрашивали метиленовым синим. Посчитывали бляшки, и процент ингибирования активности рассчитывали для каждой концентрации вещества. IC50 для каждого вещества рассчитывали, используя анализ по линейной регрессии, и результаты представлены в таблице III.

Таблица I  
Исследование с МТТ

Фракция n =	M <sub>п</sub>	IC <sub>50</sub> мкг/мл	IC <sub>50</sub> мкМ
2	976	> 2	> 24
3	1344	> 2	> 14
4	1712	> 2	> 11.6
5	2080	1.8	0.86
6	2448	0.88	0.35
7	2816	0.72	0.25
8	3184	0.7	0.21
9	3552	0.7	0.19
10-13	> 3920	1.7	~ 0.42
поли- дисперсный	2448	1.1	~ 0.44

## Таблица II

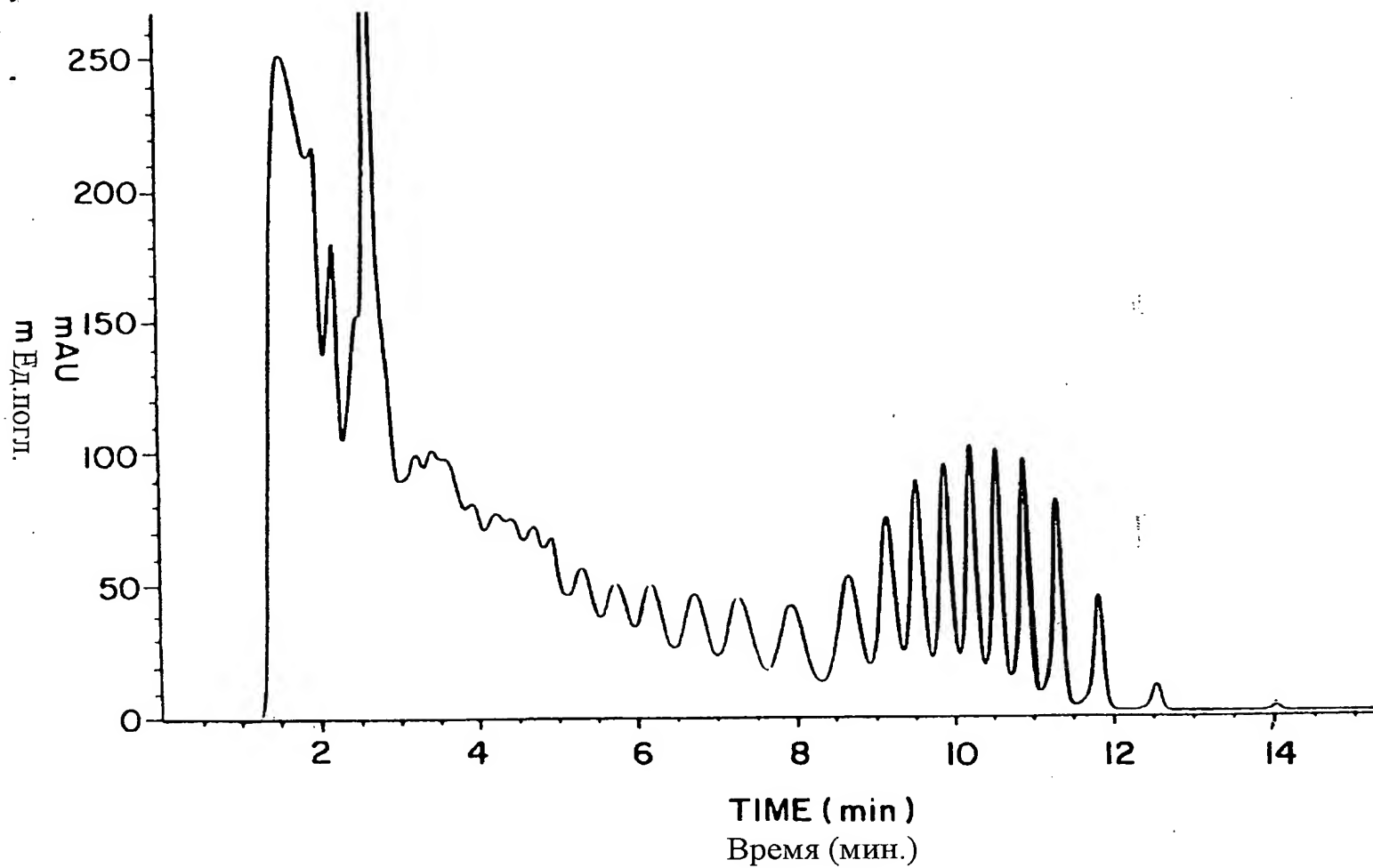
## Определение образования синцития

Фракция П =	IC <sub>50</sub> мкг/мл	IC <sub>50</sub> мкМ
2	9	9.2
3	7.8	5.8
4	1.9	1.1
5	0.35	0.17
6	0.25	0.10
7	0.15	0.05
8	0.22	0.07
9	0.14	0.04
10-13	0.36	0.09
полидисперсный	0.18	0.07

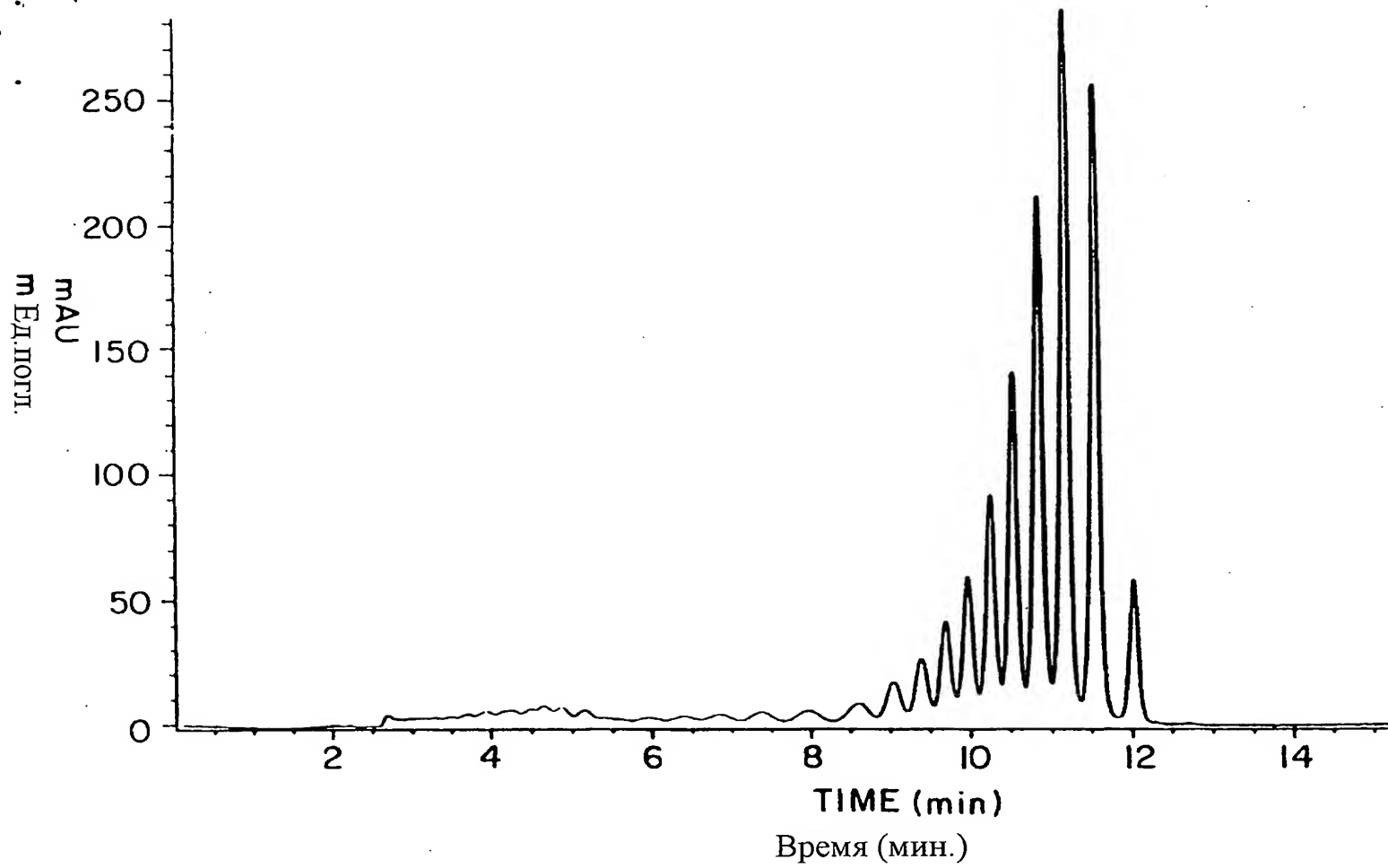
## Таблица III

II тип

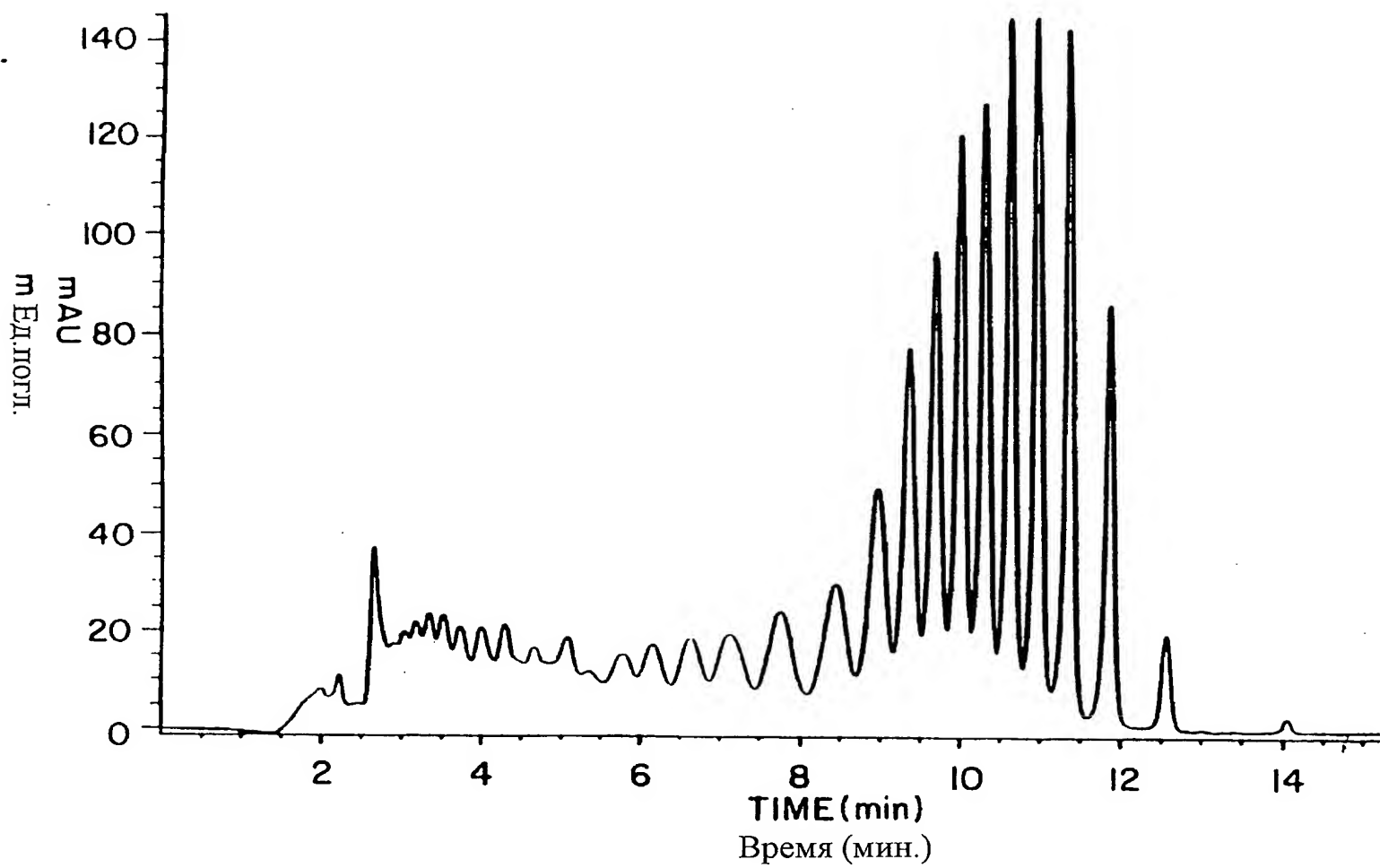
Фракция	IC <sub>50</sub> мкг/мл
п =	
2	> 10
3	< 10
4	< 10
5	< 10
6	< 1
7	< 1
8	< 1
9	< 1
10-13	< 1



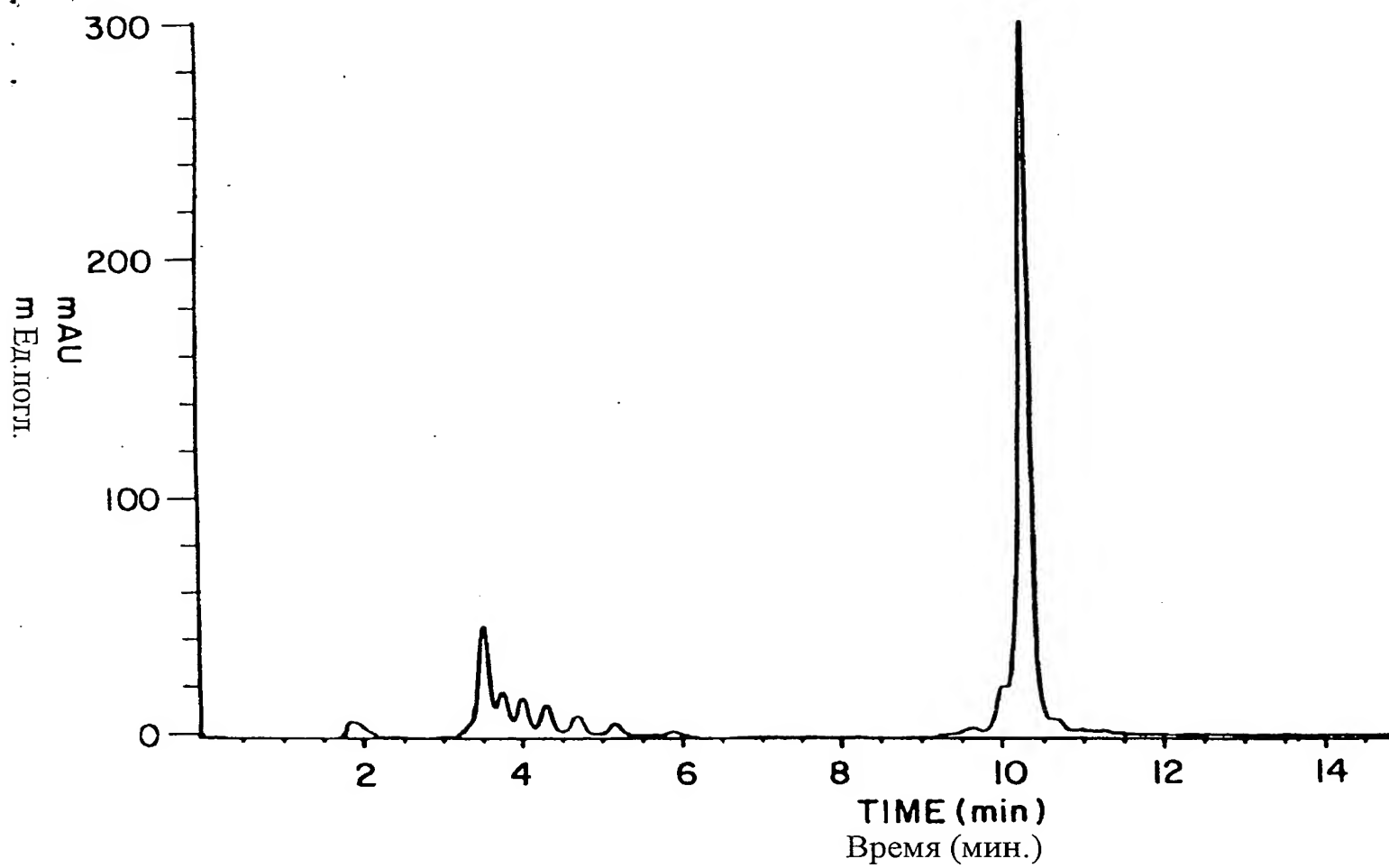
Фиг.1



Фиг.2

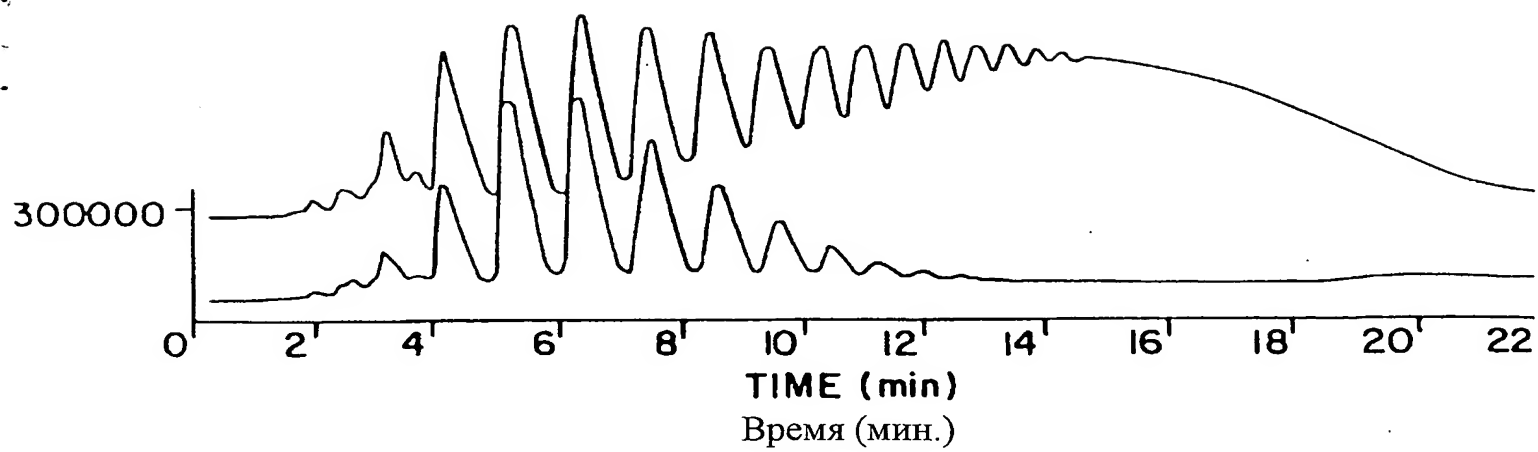


Фиг.3

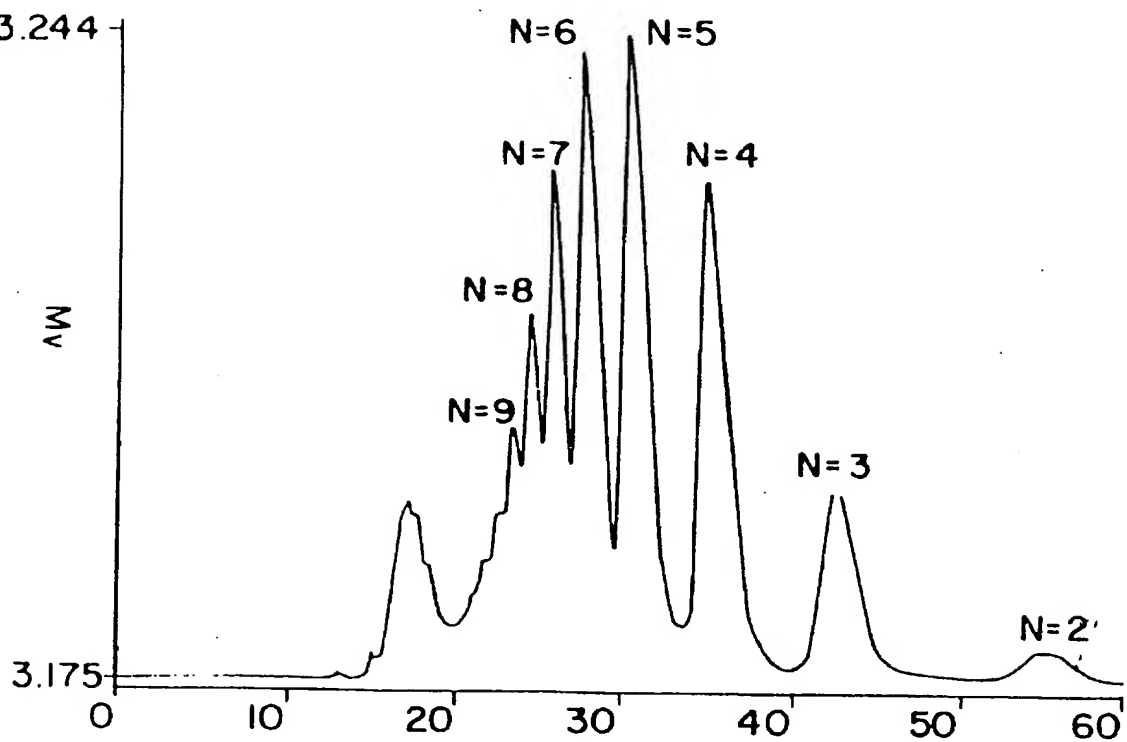


Фиг.4

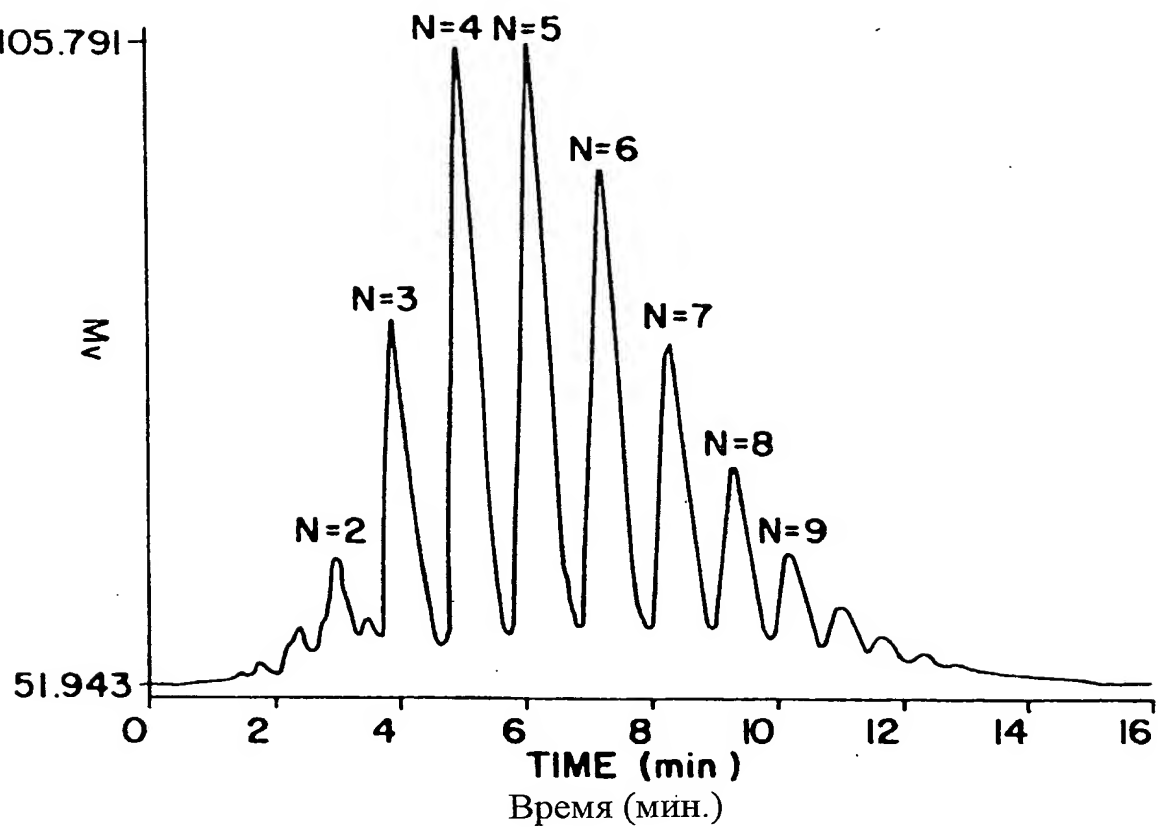




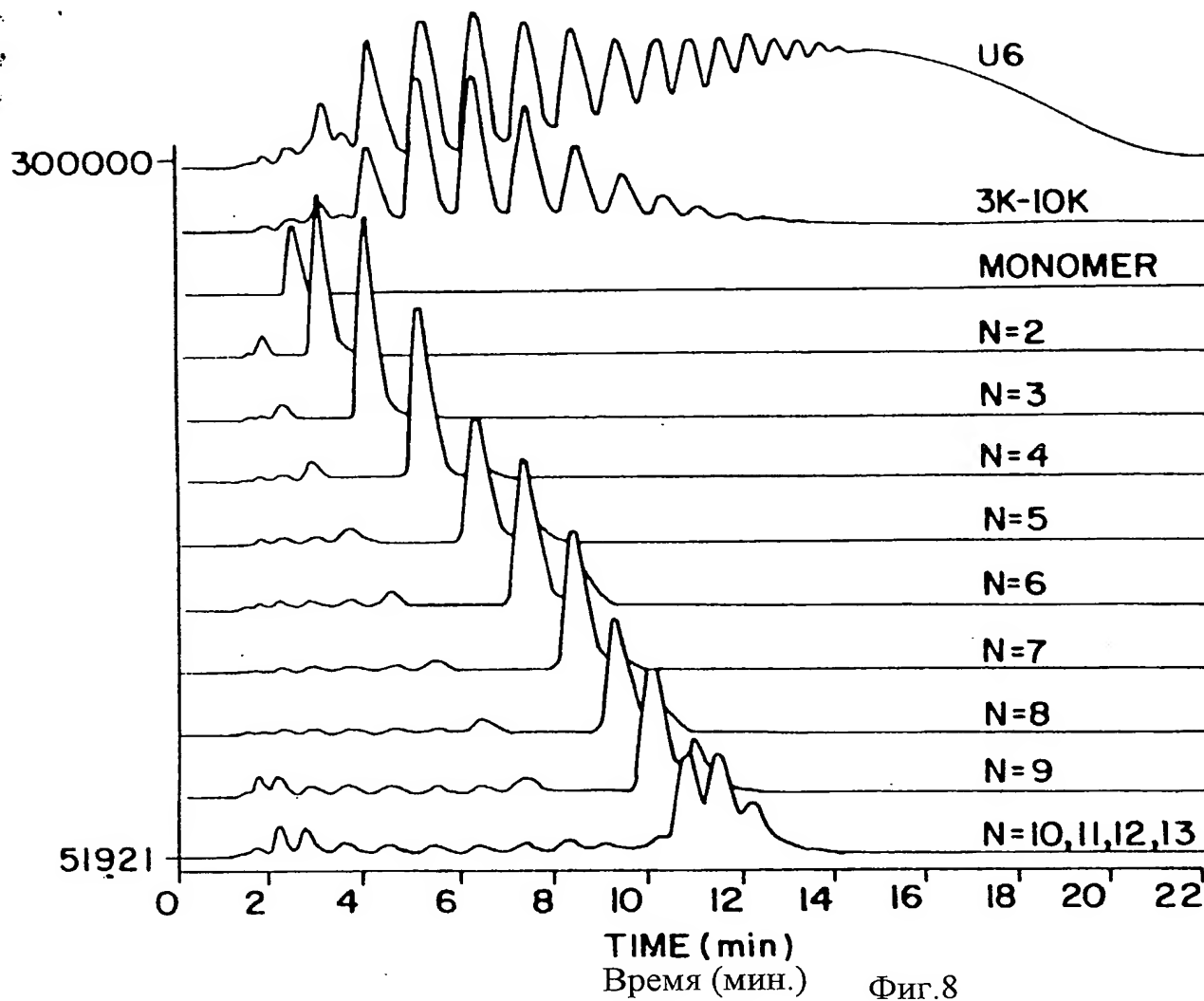
Фиг.5

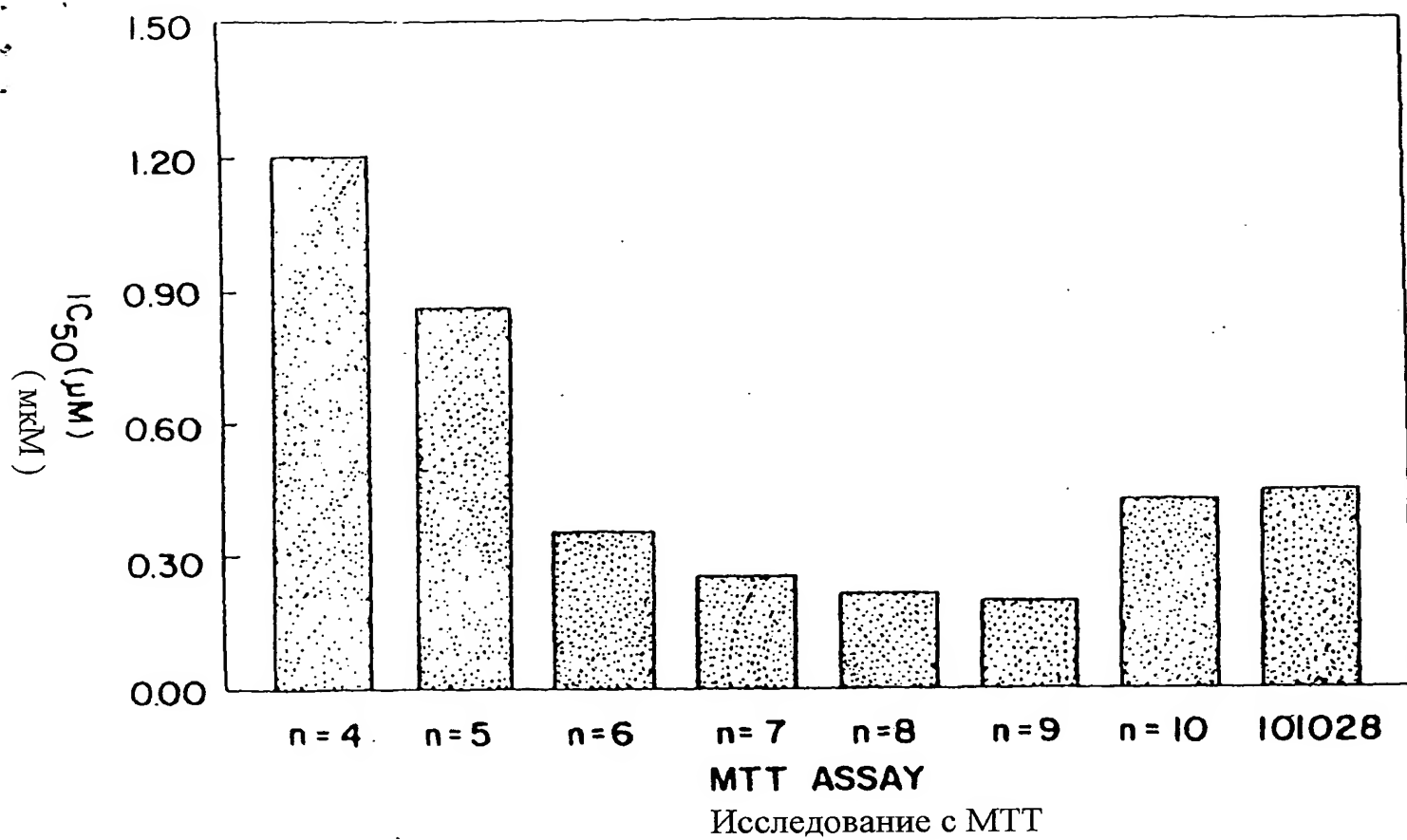


Фиг.6

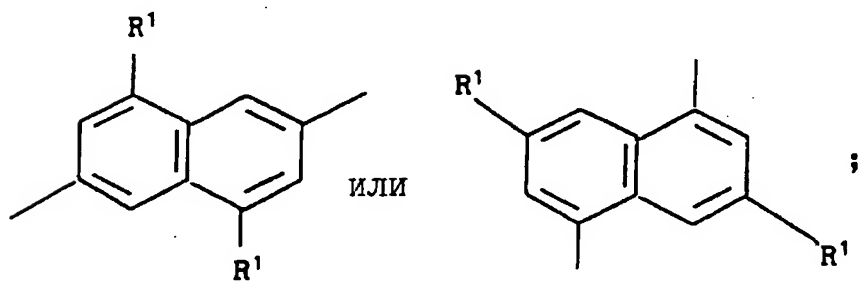
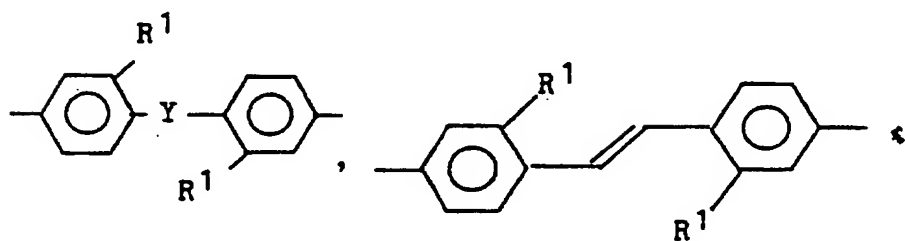
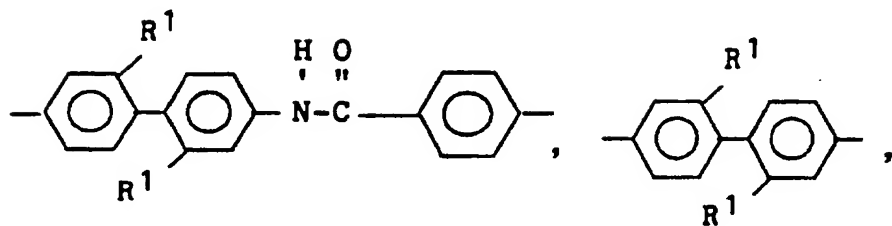
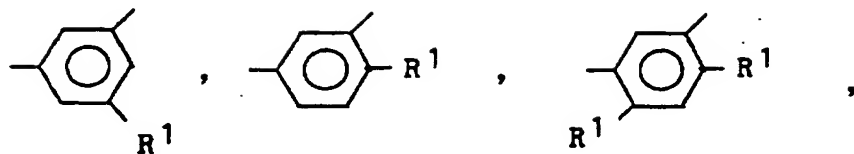
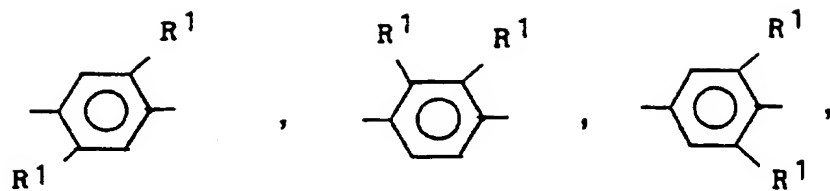


Фиг.7

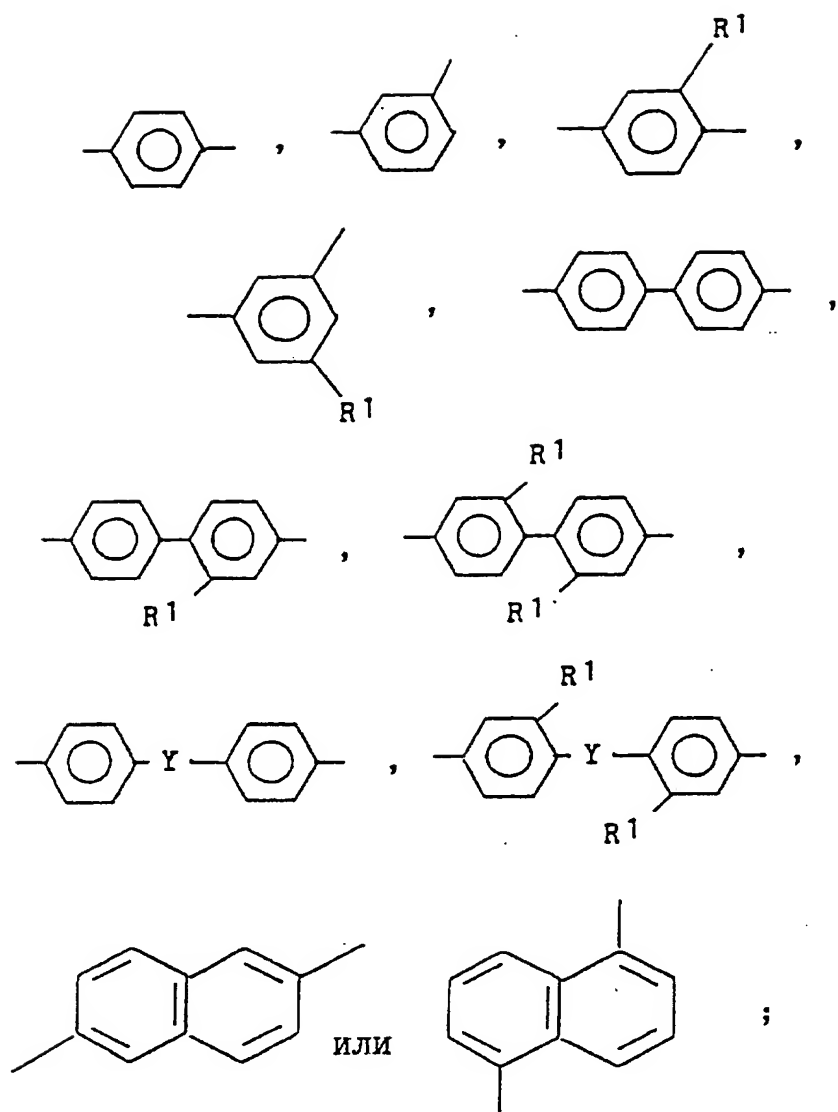




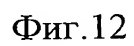
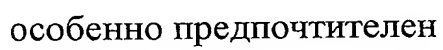
Фиг.9



Фиг.10

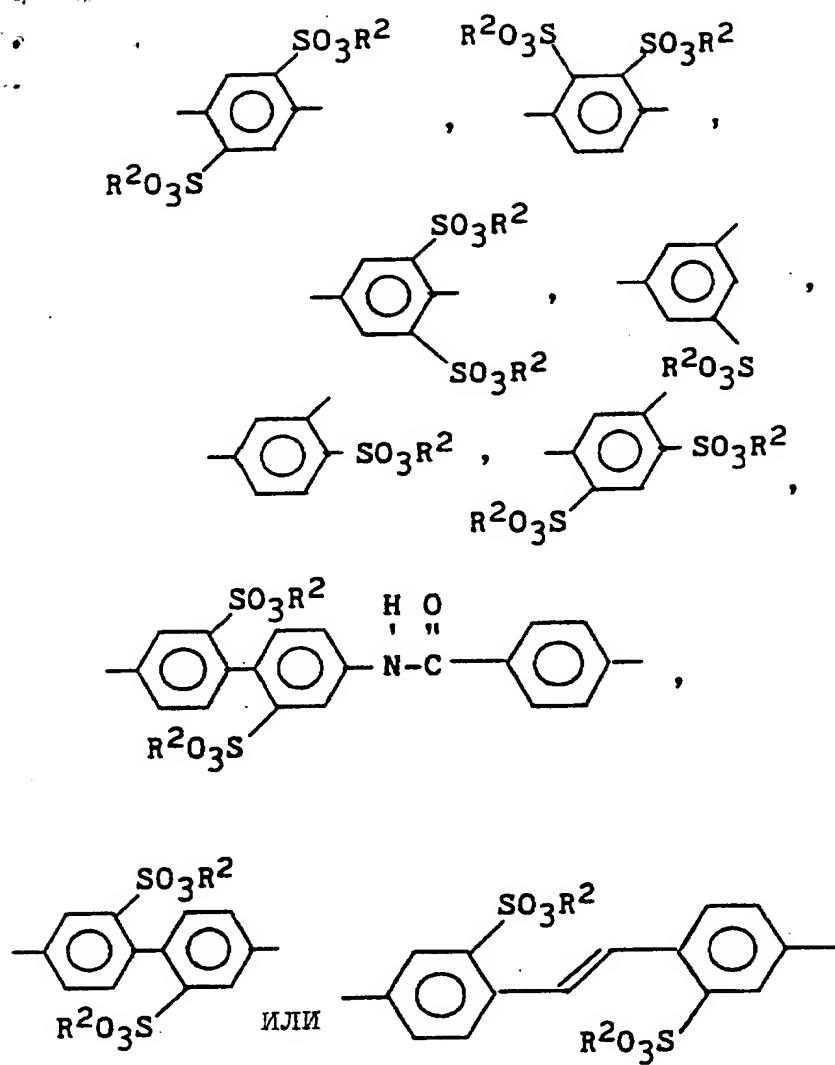


Фиг.11

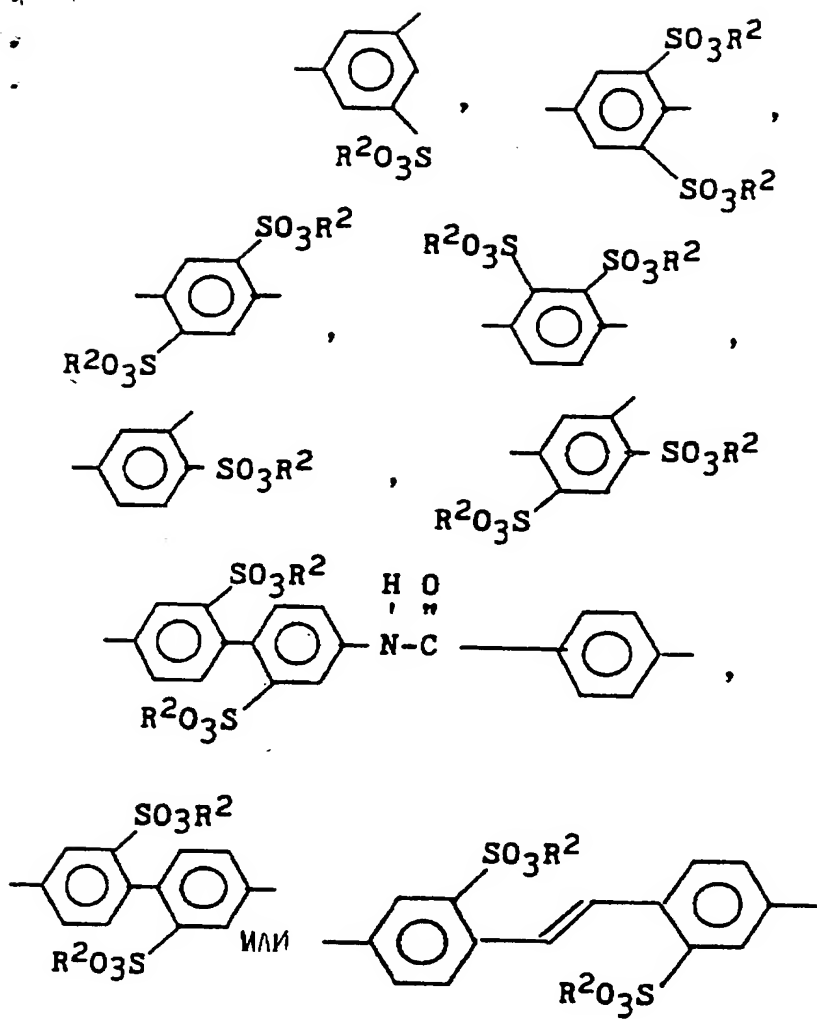


Фиг.12

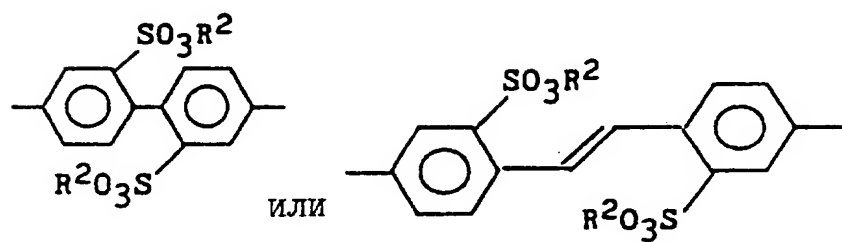
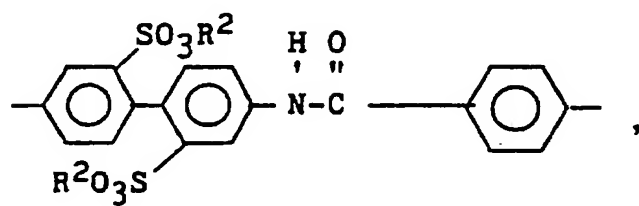
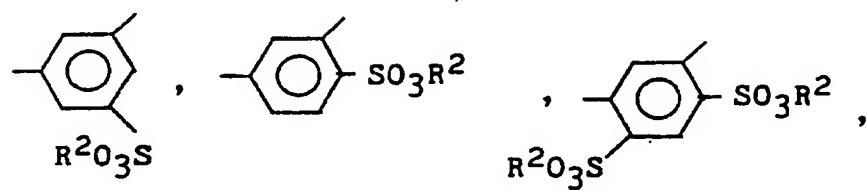
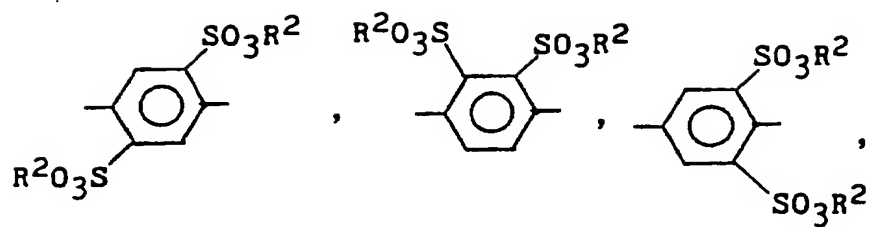




Фиг.13



Фиг.14



Фиг.15

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Документы
Предложения
Выход

Библиография

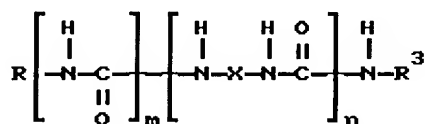
Реферат

Описание

Рисунки

## №2160746. Формула

1. Узкополи- и монодисперсный водорастворимый олигомер, который имеет отношение полидисперсности 1,0 - 1,3 и который представляет полимочевину формулы I



где R - атом водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкильная группа, фенильная группа или фенильная группа, замещенная 1 - 2 фрагментами R<sup>1</sup> и имеющая до 3 заместителей, независимо выбранных из атомов хлора или брома или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкильных групп:

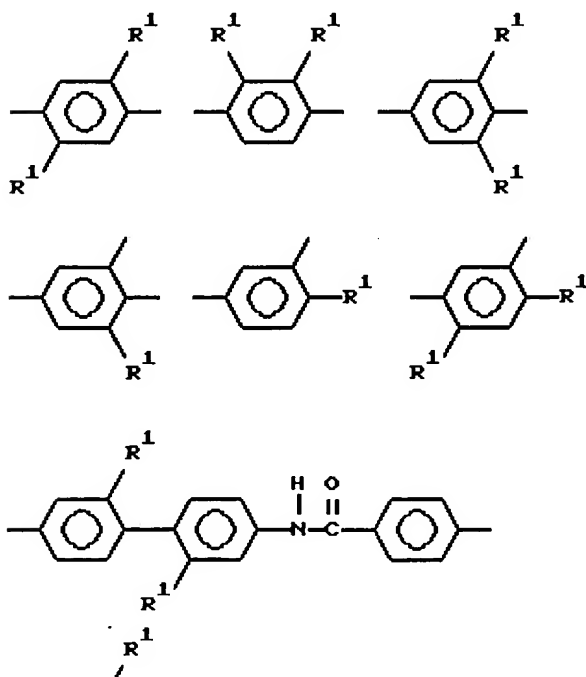
R<sup>1</sup> - -SO<sub>3</sub>R<sup>2</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, -PO<sub>3</sub>(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub> или -OPO<sub>3</sub>R<sup>2</sup>;

R<sup>2</sup> - атом водорода или фармацевтически приемлемый катион;

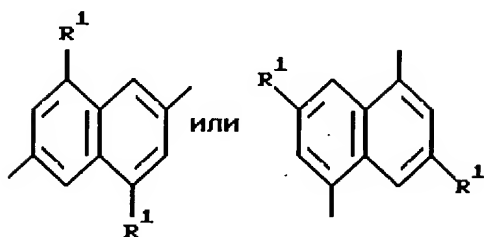
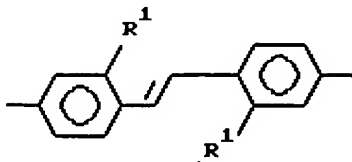
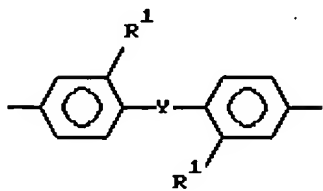
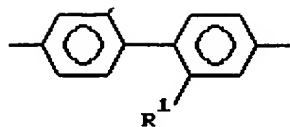
m = 0 или 1 при условии, что если

m = 0, R является атомом водорода,

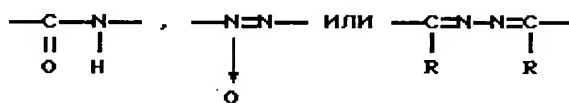
X представляет



У Вас осталось  
29 запросов  
(8,7 у.е.)  
(0 руб.)



где Y -  $-\text{CO}_2-$ ,  $-\text{C}=\text{C}-$ ,  $-\text{N}=\text{N}-$ ,



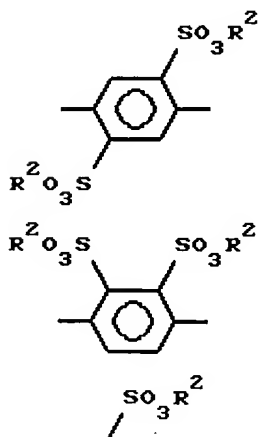
$n = 3 - 15$ , целое число,

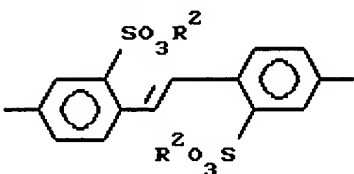
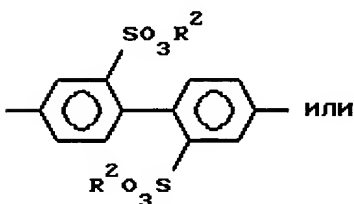
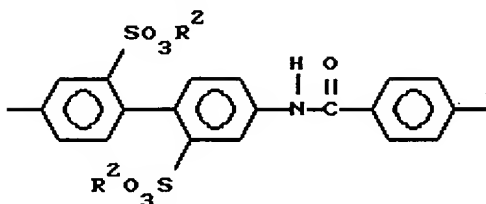
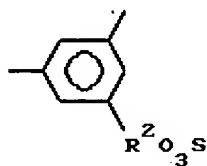
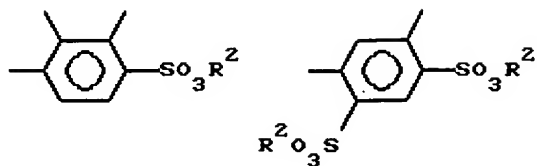
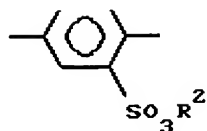
$\text{R}^3$  -  $-\text{R}$  или  $-\text{X}-\text{NH}_2$ , где R и X имеют значения, приведенные выше.

2. Олигомер по п.1, где  $n = 5 - 10$ .

3. Олигомер по п.2, где  $n = 6 - 9$ .

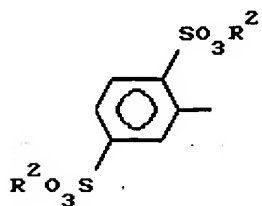
4. Олигомер по п.1, который является полимочевиной с формулой I, где  $n = 3 - 15$  и X представляет



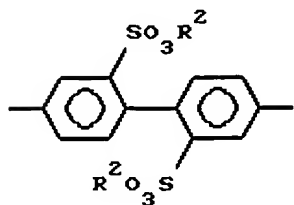


$R^2$  имеет значения, определенные в п.1.

5. Олигомер по п.4, где R и  $R^3$  являются 4-метилфенилом,  $R^2$  - водород, X является



6. Олигомер по п.4, где X является



$R^2$  - то же, что и в п.1.

7. Олигомер по п.4, где R является фенильной группой, замещенной 1 - 2 фрагментами  $R^1$  и до 3 бромзаместителями.

8. Узкополидисперсный олигомер по пп.1, 4 и 7, который имеет отношение полидисперсности 1,0 - 1,2.

9. Монодисперсный олигомер по пп.1, 4 и 7, который имеет отношение полидисперсности 1,0 - 1,1.

10. Монодисперсный олигомер по п.7, который имеет отношение полидисперсности 1,05.

11. Фармацевтический препарат, ингибирующий активность вирусов ВИЧ-1 и HSV-2, отличающийся тем, что содержит фармацевтически эффективное количество узкополи- или монодисперсного олигомера по любому из пп.1 - 10 с фармацевтически приемлемым носителем.

12. Способ ингибирования активности вирусов ВИЧ-1 и HSV-2 *in vitro* с помощью ингибитора вирусной активности, отличающийся тем, что в качестве ингибитора вирусной активности используют фармацевтический препарат по п.11 в эффективном количестве.

13. Способ получения узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров по п.1, заключающийся в том, что проводят ограничение соответствующей неочищенной полидисперсной смеси анионных олигомеров до узкополидисперсной смеси анионных олигомеров путем гель-фильтрации, избирательного осаждения, мембранного разделения или хроматографии с обращенной фазой, которые дают в результате желаемое отношение полидисперсности 1,0 - 1,3.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что включает дополнительную стадию превращения соли узкополидисперсного анионного олигомера в желаемую фармацевтически приемлемую соль.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что отношение

16. Способ по п. 13, отличающийся тем, что отношение полидисперсности олигомера равно 1,0 - 1,1.

17. Способ получения узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров по п. 1, заключающийся в том, что выделяют монодисперсный анионный олигомер с помощью электрофореза в геле или хроматографии с обращенной фазой.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что включает дополнительную стадию превращения соли узкополидисперсного анионного олигомера в желаемую фармацевтически приемлемую соль.

19. Способ по п.17, отличающийся тем, что чистота монодисперсного материала составляет по меньшей мере 75%.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что чистота монодисперсной фракции составляет от примерно 85 до примерно 100%.

21. Способ получения узкополи- и монодисперсных анионных олигомеров по п.1, заключающийся в том, что проводят ограничение соответствующей неочищенной полидисперсной смеси анионных олигомеров до узкополидисперсной смеси анионных олигомеров путем гель-фильтрации, избирательного осаждения, мембранного разделения или хроматографии с обращенной фазой, которые дают в результате желаемое отношение полидисперсности 1,0 - 1,3; выделяют монодисперсный анионный олигомер с помощью электрофореза в геле или хроматографии с обращенной фазой.

22. Способ по п.21, отличающийся тем, что включает дополнительную стадию превращения соли узкополи- или монодисперсного анионного олигомера в желаемую фармацевтически приемлемую соль.

23. Способ по пп.13, 14, 17, 18, 21 и 22, отличающийся тем, что олигомер является полимочевиной с формулой I и n означает монодисперсную фракцию 5 - 10.



24. Способ по п.23, отличающийся тем, что олигомер является полимочевинной с формулой I и n означает монодисперсную фракцию 6 - 9.

25. Способ по пп.14, 18 и 22, отличающийся тем, что соль является аммониевой, натриевой или калиевой солью.

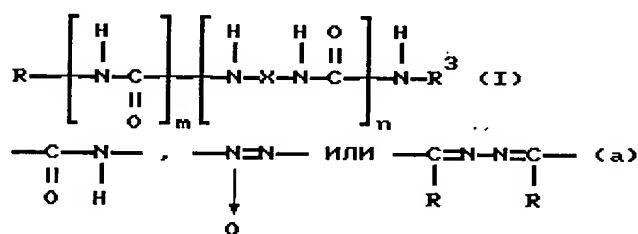
26. Способ по пп. 14, 18 и 22, отличающийся тем, что дополнительная стадия выполняется путем ионного обмена или добавления соли слабой летучей кислоты.

Бибблиография	Реферат	Описание	Рисунки
---------------	---------	----------	---------

## №2160746. Реферат

Описывается узкополи- и монодисперсный водорастворимый олигомер, который имеет отношение полидисперсности 1,0 - 1,3 и который представляет полимочевину формулы (I), где R - атом водорода, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, алкильная группа, фенильная группа или фенильная группа, замещенная 1 - 2 фрагментами R<sup>1</sup> и имеющая до 3 заместителей, независимо выбранных из атомов хлора или брома или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкильных групп; R<sup>1</sup> - SO<sub>3</sub>R<sup>2</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, -PO<sub>3</sub>(R<sup>2</sup>)<sub>2</sub> или -OPO<sub>3</sub>R<sup>2</sup>; R<sup>2</sup> - атом водорода или фармацевтически приемлемый катион; m = 0 или 1 при условии, что если m = 0, R является атомом водорода; X - ароматический заместитель, значения которого описаны в п.1 формулы; Y - -CO<sub>2</sub>-, -C=C-, -N=N- или (a), n = 3 - 15, целое число; R<sup>3</sup> представляет -R или -X-NH<sub>2</sub>, где R и X имеют приведенные выше значения. Соединения проявляют биологическую активность против вируса человеческого иммунодефицита.

Описывается также фармацевтический препарат на их основе, способ получения олигомера, способ ингибирования активности вирусов. 6 с. и 20 з.п. ф-лы, 15 ил., 3 табл.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**